

# **ADAPTAÇÃO DE UMA MICROALGA DO GÉNERO ARTHROSPIRA A UM MEIO SALINO PARA BIORREFINARIA**

**FRANCISCA MARTA SILVA DE AZEREDO LOBO**  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM  
ÁREA CIENTÍFICA

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## *Adaptação de uma microalga do género *Arthrospira* a um meio salino para biorrefinaria*

### Tese de Mestrado

De

Francisca Marta Silva de Azeredo Lobo

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em



Orientador na FEUP: Doutora Teresa Margarida Correia de Poço Mata

Orientador no ISEP: Professora Doutora Nídia de Sá Caetano

Supervisor na A4F: Dr. Vitor Verdelho Vieira



Departamento de Engenharia Química

Fevereiro de 2016



## Agradecimentos

Antes de mais gostaria de agradecer a oportunidade que me foi oferecida pelo Dr. Vítor Verdelho, pois sem ela não teria desenvolvido a minha dissertação de conclusão de curso sobre este tema de grande interesse pessoal.

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras de dissertação Doutora Teresa Mata e Professora Doutora Nídia Caetano, por todo o apoio, simpatia e orientação. Mas especialmente à Professora Doutora Nídia Caetano pela confiança, pela paciência e pela disponibilidade sempre que precisei, principalmente todos os sábados e dias em que o laboratório esteve fechado.

Agradeço ao Engenheiro Cláudio Silva, pela orientação, pelas explicações, pelas ideias, pela paciência e toda a ajuda prestada durante a realização desta dissertação.

Quero agradecer a todos os técnicos, engenheiros e auxiliares do Laboratório de Tecnologia Química do ISEP, pela disponibilidade e por toda a ajuda prestada. E à Amanda Quintela pela boa disposição, companhia e ajuda.

Quero também agradecer à minha família por todo o apoio incondicional, pela paciência interminável e por toda a força e energia positiva que me deram no decorrer deste trabalho.

Gostaria ainda de agradecer às minhas colegas de faculdade e laboratório, Isabel Trovisco e Ana Pinto, pela companhia, e à minha amiga Andreia Ferreira, pelo apoio.



## Resumo

A exploração comercial de *Arthrospira* (ou *Spirulina*) teve início na década de 1960, continuando actualmente a ser explorada para aplicação em alimentação humana, devido ao seu elevado teor proteico e excelente valor nutritivo. Os produtos à base de *Arthrospira* são vendidos em todo o mundo como alimento dietético/funcional em lojas dedicadas à alimentação saudável. Como ração animal, a *Arthrospira* tem a sua utilização mais ampla na indústria da aquicultura e de aves.

Em Portugal a *Arthrospira* não foi, até agora, explorada comercialmente, uma vez que a sua produção económica ainda requer algum trabalho de investigação e desenvolvimento. Assim, esta dissertação analisou uma das espécies mais frequentemente usadas para consumo humano e animal, a *Arthrospira platensis*, com o objectivo de avaliar o seu crescimento e adaptação à salinidade para posterior utilização na indústria alimentar. O interesse nesta adaptação reside na crescente necessidade de novos alimentos mais ricos em proteína e outros nutrientes, que possam ser rapidamente disponibilizados ao consumidor, que não ocupem terrenos aráveis ou que possam mesmo ser cultivados *offshore* e que não consumam água potável/doce, ou mesmo, que contribuam para o tratamento de efluentes residuais de indústrias alimentares, como o efluente cervejeiro por exemplo.

Deste modo, pretendeu-se estudar a viabilidade de se usar água com elevada salinidade (semelhante à água do mar) como fonte de micronutrientes para cultivo e produção de microalgas, particularmente a *Arthrospira platensis*. Assim, o objectivo desta dissertação é a optimização das condições de cultivo, em meio salino, e adaptação ambiental em Portugal, de uma variedade do género *Arthrospira* para a sua valorização em biorrefinaria, com vista à obtenção de produtos para a indústria alimentar, de nutracêuticos e cosméticos, entre outras.

Os resultados mostram que a *Arthrospira platensis* consegue tolerar diferentes níveis de salinidade (5, 10, 15, 25, 30 e 35 g/l), tendo-se observado um período de adaptação inicial durante o qual se observou um alongamento das células, em vez da sua forma tradicional em espiral. Além disso, as condições mixotróficas usadas (com adição de 1,0 g/l de glicose ao meio de cultura) favoreceram o crescimento e a produtividade de biomassa em comparação com as condições de cultivo autotróficas no meio Zarrouk sem alteração de salinidade.

**Palavras-chave:**

*Arthrospira platensis*, biorrefinaria, cultivo mixotrófico, indústria alimentar, meio salino, *Spirulina*, teor de proteína



## Abstract

The commercial production of microalgae of the genus *Arthrospira* (or *Spirulina*) started in the 1960s, mainly for human nutrition because of its high protein content and its excellent nutritive value and as dietary supplement and ingredient in natural foods. *Arthrospira* products are sold as a dietary/functional food in health food stores worldwide. As animal feed, *Arthrospira* has found its widest use in the aquaculture and poultry industries.

Its production in Portugal is not yet commercially exploited, as it still needs some research and development work to make it a commercial reality. Hence, this work studied the most common species used for human consumption, *Arthrospira platensis*, aiming to evaluate its growth and adaptation to salinity.

Thus, this microalgae was cultivated in the laboratory, for comparing its growth rate in similar cultivation conditions, and the resulting biomass was characterized in terms of key constituents (lipids and protein) aiming at their use for biorefinery purposes. Moreover, it was studied the adaptation of *Arthrospira platensis* to salinity, by adding progressively larger amounts of NaCl (5, 10, 15, 25, 30 and 35 g/l) in three batches of tests. The salinity conditions were created in mixotrophic conditions (by adding 1.0 g/l of glucose to the cultivation medium) in comparison to their standard autotrophic conditions in the Zarrouk's medium without adding more salt.

Results show that *Arthrospira* can tolerate salinity conditions, but it was verified an elongation of the cells, during the adaptation stage, instead of their traditional spiral shape. And it was reached a good biomass productivity in the salty medium cultures. Also, the mixotrophic conditions favored the growth and biomass productivity in comparison with autotrophic conditions.

**Key-words:**

*Arthrospira platensis*, *Spirulina*, biorefinery, food industry, mixotrophic saline cultivation, protein content





## Declaração

Declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.



# Índice

<b>Índice de Figuras</b>	<b>iii</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>v</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto	1
1.1.1 Microalgas	1
1.2 Objectivo da Dissertação	3
1.3 Contributos do Trabalho	4
1.4 Organização da Tese	4
<b>2. Contexto do trabalho</b>	<b>7</b>
2.1 Empresa A4F – Algae for Future, SA	7
2.2 Microalga do género <i>Arthrospira</i>	7
2.3 Características da <i>Arthrospira</i> : Classificação e Morfologia	9
2.3.1 Espécie: <i>Arthrospira platensis</i> ; Estirpe: UTEX, LB 2340	9
2.4 Avaliação do Crescimento de Microalgas	10
2.4.1 Curva de crescimento	10
2.4.2 Parâmetros de Avaliação do Crescimento	12
2.5 Meio de cultura	12
2.5.1 Fontes nutricionais	12
2.5.2 Processo de cultivo	14
2.5.3 Sistemas de cultivo de microalgas	14
2.5.4 Métodos de colheita	16
<b>3. Descrição Técnica</b>	<b>19</b>
3.1 Objectivos e Procedimentos Genéricos	19
3.2 Parâmetros físicos fixados	21
3.3 Inoculação da <i>Arthrospira platensis</i>	21
3.3.1 Material utilizado no cultivo	21
3.3.2 Condições de Cultivo	22
3.3.3 Meio de cultura padrão – Zarrouk modificado	23
3.3.4 Solução de glicose concentrada	25
3.3.5 Controlo de contaminações	25
3.4 Curva de crescimento	25
3.4.1 Construção da curva de calibração	25
3.4.2 Avaliação do crescimento	26

3.4.3	Cálculo da concentração de biomassa produzida	26
3.5	Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria	27
3.6	Determinação do Teor de Azoto Kjeldahl	28
<b>4.</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>29</b>
4.1	Monitorização de possíveis contaminações	29
4.2	Avaliação do crescimento da <i>Arthrospira platensis</i>	29
4.3	Quantificação de óleos por gravimetria	36
4.4	Determinação do Teor de Azoto Kjeldahl	37
<b>5.</b>	<b>Conclusões e Trabalho Futuro</b>	<b>39</b>
5.1	Conclusões	39
5.2	Objectivos Realizados	39
5.3	Outros Trabalhos Realizados	40
5.4	Limitações e Trabalho Futuro	40
5.5	Apreciação final	41
	<b>Referências</b>	<b>43</b>
	<b>Anexo 1. Curva de Calibração para a <i>Arthrospira platensis</i></b>	<b>45</b>
	<b>Anexo 2. Avaliação do crescimento microalgal</b>	<b>47</b>
	<b>Anexo 3. Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria</b>	<b>55</b>
	<b>Anexo 4. Determinação do teor de Azoto Kjeldhal</b>	<b>59</b>
	<b>Anexo 5. Determinação da massa de água contida na biomassa microalgal húmida</b>	<b>65</b>
	<b>Anexo 6. Gráficos Absorvância vs Comprimento de onda (nm), para determinação do pico de absorvância das microalgas (varrimento)</b>	<b>67</b>

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Imagens de microscópio óptico com ampliação (a) 40x e (b) 100x, respectivamente, da <i>Arthrospira platensis</i> UTEX LB 2340.....	10
<b>Figura 2</b> - Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor batch (linha a cheio) e decréscimo de nutrientes (linha tracejada) <sup>[1]</sup> .....	11
<b>Figura 3</b> - Esquema exemplificativo dos ensaios, culturas e inóculos usados. ....	20
<b>Figura 4</b> - Condições de cultivo: matrizes inoculados, lâmpadas, arejamento e bancada. ....	22
<b>Figura 5</b> - Distribuição dos matrizes na bancada, segundo a uma curva de igual intensidade luminosa. ....	23
<b>Figura 6</b> - Extracção de lípidos da biomassa microalgal. ....	27
<b>Figura 7</b> - Destilação para a determinação do teor de Azoto Kjeldhal.....	28
<b>Figura 8</b> - Curvas de crescimento [Biomassa seca] (g/l) vs tempo, do primeiro ensaio.....	30
<b>Figura 9</b> - Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> em regime mixotrófico com 1,0 g/l de glicose, no primeiro ensaio.....	31
<b>Figura 10</b> - Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> de 15 g NaCl/l, na fase de adaptação, no primeiro ensaio	31
<b>Figura 11</b> - Curvas de crescimento [Biomassa seca] (g/l) vs tempo, no segundo ensaio.....	32
<b>Figura 12</b> - Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> na fase de adaptação, no segundo ensaio.....	33
<b>Figura 13</b> - Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> em regime mixotrófico com 1,0 g/l de glicose, no segundo ensaio e após a fase de adaptação.....	33
<b>Figura 14</b> - Curvas de crescimento [Biomassa seca] (g/l) vs tempo, no terceiro ensaio.....	34
<b>Figura 15</b> - Culturas de <i>Arthrospira platensis</i> em regime mixotrófico com 1,0 g/l de glicose, no terceiro ensaio e no primeiro dia de cultivo .....	35
<b>Figura 16</b> - Curvas de crescimento [Biomassa seca] (g/l) vs Dias, no terceiro e quarto ensaio .....	35
<b>Figura 17</b> - Curva de calibração da absorvância da <i>Arthrospira platensis</i> , para concentrações superiores a 0,1 g/l, a 682 nm.....	46
<b>Figura 18</b> - Curva de calibração da absorvância da <i>Arthrospira platensis</i> , para concentrações inferiores a 0,1 g/l, a 682 nm.....	46
<b>Figura 19</b> - Procedimento para determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de digestão (1/2) .....	59
<b>Figura 20</b> - Procedimento para determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de digestão (2/2) .....	60
<b>Figura 21</b> - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (1/4) .....	61
<b>Figura 22</b> - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (2/4) .....	62
<b>Figura 23</b> - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (3/4) .....	63
<b>Figura 24</b> - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (4/4) .....	63
<b>Figura 25</b> - Varrimento para uma amostra de <i>Arthrospira maxima</i> .....	67
<b>Figura 26</b> - Varrimento para uma amostra de <i>Arthrospira platensis</i> .....	68



# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Comparação do cultivo em massa de microalgas em sistemas abertos e fechados <sup>[1]</sup> .....	15
<b>Tabela 2</b> - Composição do meio de cultura padrão de <i>Arthrospira platensis</i> – Zarrouk modificado.....	24
<b>Tabela 3</b> - Teor de lípidos totais na <i>Arthrospira platensis</i> resultante do ensaio 1 .....	36
<b>Tabela 4</b> - Resultados da determinação do teor de Azoto na <i>Arthrospira platensis</i> do ensaio 1 .....	37
<b>Tabela 5</b> - Valores esperados do teor de azoto e da percentagem de proteína na <i>Arthrospira platensis</i> .	38
<b>Tabela 6</b> - Valores de absorvância determinados para as 12 soluções padrão. ....	45
<b>Tabela 7</b> - Avaliação do crescimento no primeiro ensaio .....	47
<b>Tabela 8</b> - Avaliação do crescimento no terceiro ensaio .....	49
<b>Tabela 9</b> - Avaliação do crescimento no terceiro ensaio .....	51
<b>Tabela 10</b> - Avaliação do crescimento da <i>Arthrospira platensis</i> no quarto ensaio .....	53
<b>Tabela 11</b> - Determinação do teor de biomassa seca.....	65





## Notação e Glossário

Abs - Absorvância

Conc. – Concentração

m - Massa

P - Peso

rpm – Rotações por minuto

T – Temperatura

t - Tempo (s)

V - Volume

$\rho$  - Massa volúmica

°C – Grau Celcius

## Siglas

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**GLA** – Ácido gama-linolénico

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**IEA Bioenergy** – International Energy Agency Bioenergy

**N** – Azoto

**NaCl** – Cloreto de sódio

**O<sub>2</sub>** – Oxigénio

**SAG** – *Culture Collection of Algae at Goettingen University, Alemanha*

**UTEX** – Universidade do Texas

**UV** – Radiação na zona do ultravioleta

**Vis** - Radiação na zona do visível



# 1. Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

### 1.1.1 Microalgas

As microalgas são organismos fotossintéticos, eucarióticos ou procarióticos, cujo tamanho varia entre cerca de 0,2 a 200  $\mu\text{m}$ . São facilmente encontrados em todo o tipo de ecossistemas aquáticos ou terrestres, graças à sua estrutura simples multicelular ou unicelular, onde crescem e se desenvolvem rapidamente, chegando mesmo a estar presentes em ambiente hostis. Estes organismos encontram-se representados na superfície terrestre por uma imensa variedade de espécies. Pensa-se que existam mais de 50000, no entanto apenas são estudadas 30000 espécies <sup>[1]</sup>.

Aproximadamente metade do oxigénio atmosférico é produzido pelas microalgas, usando uma parte dos gases responsáveis pelo efeito de estufa, e são também a base de algumas cadeias alimentares. Assim, desempenham um papel importantíssimo na viabilização da vida na Terra.

### 1.1.2. Potenciais Aplicações

O cultivo de microalgas é relativamente simples, requer poucos ou nenhuns cuidados, os nutrientes necessários são fáceis de obter e podem ser conseguidos a partir de uma água imprópria para consumo humano. Acresce ainda que as microalgas se conseguem desenvolver com pouca ou nenhuma água. Resumindo, são práticas do ponto de vista de cultivo e quando comparadas com outras plantas, aquáticas ou não, têm maiores taxas de crescimento e rendimento, além de exigirem uma área de solo (arável ou não) muito menor. Assim, é fácil de perceber a vasta gama de aplicações em diferentes actividades onde as microalgas poderão desempenhar um papel melhor do que as actuais matérias-primas usadas.

Por exemplo, a fixação biológica de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) através da fotossíntese, permite às microalgas produzirem biomassa enquanto contribuem para o controlo da poluição. Têm ainda a capacidade de fixação de outros compostos, como o azoto e o fósforo, a partir de águas residuais industriais e domésticas, tratando-as parcialmente. E é partindo da biomassa formada, neste processo integrado, que é possível produzir biocombustíveis, fertilizantes, alimento humano e animal (aquático ou terrestre) devido ao seu elevado valor nutricional e aos seus pigmentos. Estes pigmentos, além de serem usados na indústria alimentar, também

podem ser usados na indústria farmacêutica e cosmética, onde têm grande interesse visto não serem solúveis em água ou suor.

Foi ainda observado em diversos estudos o valor nutracêutico das microalgas, estimulando o sistema imunitário, actuando como inibidores de replicação de vírus, aumentando a concentração de hemoglobina e baixando os níveis de açúcar no sangue, entre outros [1-3].

Acresce ainda que, a partir da biomassa das microalgas, é possível separar diferentes compostos, tais como óleos, ácidos gordos, proteínas, enzimas, pigmentos, antioxidantes, polissacarídeos, ficobiliproteínas, vitaminas, minerais, outros compostos bioactivos e químicos finos de elevado valor no mercado, que são usados nas mais diferentes indústrias.

### 1.1.3. Biorefinaria

Sendo as microalgas uma fonte de biomassa que apresenta uma constituição complexa e variável, permitindo a formulação de vários produtos e energia, é possível fazer a separação dos seus constituintes através de um processo integrado sustentável. Este processo é denominado biorefinaria.

O conceito de biorefinaria é, assim, aproximado ao de uma refinaria de petróleo, sendo também necessária uma separação primária em grupos de substâncias seguida de um tratamento secundário e processamento das mesmas, por forma a darem lugar a uma vasta gama de produtos e energia [4].

Ao contrário do que se verifica numa refinaria de petróleo, a biorefinaria é sustentável, pode usar todo o tipo de biomassa como matéria-prima e os seus produtos podem ser finais ou intermediários.

A grande maioria dos biocombustíveis e bioquímicos existentes são produzidos por cadeias unitárias de produção e não em sistemas integrados como se pretende nas biorefinarias. Assim, é comum que a produção dos mesmos implique a utilização de solo arável e materiais que competem directamente com a produção de alimentos para humanos e animais [5].

A *International Energy Agency Bioenergy* (IEA Bioenergy) Task 42 definiu biorefinaria como um processamento sustentável da biomassa num espectro de produtos com valor de mercado e energia [6].

No caso das microalgas, por exemplo, a integração do processo pode ser conseguida através do uso de um efluente residual urbano ou de uma indústria como fonte de nutrientes. Assim,

realiza-se o tratamento parcial do efluente, produzindo biomassa a partir deste, dando depois lugar a outros produtos e aproveitando meticulosamente todos os produtos metabólicos das microalgas, para diferentes fins, tais como farmacêuticos, nutracêuticos, biocombustíveis, cosméticos, entre outros.

O trabalho a desenvolver nesta dissertação, tem como objectivo a adaptação de uma microalga para cultivo industrializado em Portugal, em meio salino, com vista à sua aplicação numa biorefinaria, tornando exequível após fraccionamento, o aproveitamento da maior quantidade possível de produtos metabólicos.

## 1.2 Objectivo da Dissertação

O objectivo desta dissertação é a optimização das condições de cultivo, em meio salino, e adaptação ambiental em Portugal, de uma variedade do género *Arthrospira* (ou *Spirulina*) para a sua valorização em biorrefinaria, com vista à obtenção de produtos para a indústria alimentar, de nutracêutica, cosmética, entre outras.

Primeiramente será necessário seleccionar uma estirpe do género *Arthrospira*, com maior capacidade de crescimento e adaptação às condições atmosféricas e ambientais em Portugal. Esta estirpe deverá ter a capacidade de se desenvolver, simultaneamente, em água salgada e mixotroficamente.

Numa primeira etapa, serão estudados os procedimentos para o cultivo em água salgada como meio padrão e será posteriormente feita a quantificação de proteínas e lípidos existentes na biomassa resultante do crescimento nesse mesmo meio.

Será feita a avaliação desta estirpe relativamente ao seu desenvolvimento e à sua taxa de produção de biomassa. Em seguida, será realizada uma análise quantitativa e qualitativa da composição da biomassa da microalga, com a finalidade de avaliar a sua aplicabilidade após o fraccionamento para utilização em biorrefinaria, avaliando, por exemplo, a quantidade de lípidos, proteína e pigmentos. Neste sentido serão estudadas técnicas de fraccionamento que melhor se enquadrem nos resultados da análise da composição da biomassa.

## 1.3 Contributos do Trabalho

A produção comercial de *Arthrospira* teve início na década de 1960 e actualmente continua a ser explorada. Porém o principal objectivo passou a ser a sua aplicação na área alimentar como complemento dietético e/ou como ingrediente em alimentos naturais.

Em Portugal a *Arthrospira* não é, até agora, explorada comercialmente, uma vez que ainda requer algum trabalho de investigação e desenvolvimento. Assim, esta dissertação analisou uma das espécies mais comumente usada para consumo humano e animal, a *Arthrospira platensis*, com o objectivo de avaliar o seu crescimento e adaptação à salinidade para posterior utilização na indústria alimentar. O interesse nesta adaptação reside na crescente necessidade de novos alimentos mais ricos em proteína e outros nutrientes, que possam ser rapidamente disponibilizados ao consumidor, que não ocupem terrenos aráveis ou que possam mesmo ser cultivados *offshore* e que não consumam água potável/doce, ou mesmo que contribuam para o tratamento de efluentes residuais de indústrias alimentares, como o efluente cervejeiro por exemplo.

Deste modo, neste trabalho pretende-se estudar a viabilidade de usar a água do mar como fonte de nutrientes para cultivo e produção de microalgas, associando ainda o cultivo em condições mixotróficas, usando-se particularmente a *Arthrospira platensis*.

Como a composição da água do mar é quase constante, variando ligeiramente de oceano para oceano, para se proceder à adaptação de um modo controlado, procedeu-se a uma adaptação gradual ao meio salino, pela simples adição de sal (NaCl) ao meio de cultura convencional, o meio Zarrouk. Simultaneamente, o meio foi também suplementado pela adição de glicose, numa concentração de 1 g/l.

## 1.4 Organização da Tese

O conteúdo desta dissertação está estruturado em 4 capítulos, cujo teor se encontra resumido em seguida.

No **Capítulo 1** descreve-se o enquadramento da tese e os objectivos da mesma.

No **Capítulo 2** apresenta-se o contexto do trabalho. Além disso, é apresentado um breve esclarecimento dos motivos que conduziram à escolha da *Spirulina* e algumas referências

relativamente à avaliação do crescimento microalgal, meio de cultura, processo de cultivo e métodos de colheita.

No **Capítulo 3** apresenta-se a descrição técnica e justificação do modo de operação nas diferentes etapas do trabalho e expõem-se os resultados obtidos e a discussão dos mesmos.

O **Capítulo 4** reflecte as conclusões do estudo desenvolvido. É também neste capítulo que é feita a avaliação do trabalho concretizado e é onde se referem os objectivos efectivamente atingidos e as respectivas limitações. É ainda neste capítulo que se apresentam as propostas para o trabalho futuro.





## 2. Contexto do trabalho

### 2.1 Empresa A4F - Algae for Future, SA

A A4F é uma empresa com 12 anos e muita experiência em cultivo e produção industrial de vários tipos de microalgas, aplicando diferentes tecnologias e escalas de operação. Esta empresa surgiu de uma *spin-out* da Necton, S.A para se dedicar unicamente ao desenvolvimento e implementação de projectos de bioengenharia para produção industrial de microalgas. A empresa tem laboratórios e uma unidade experimental em Lisboa no *Campus* do LNEG no Lumiar.

A A4F promove a mitigação do CO<sub>2</sub> em indústrias com emissões elevadas com soluções específicas para cada cliente, sendo que a biomassa produzida é valorizada no sentido do aproveitamento do maior número de compostos possível, através da sua aplicação numa biorrefinaria. Assim, o aproveitamento e uso de gases de efeito de estufa como fonte de nutrientes para as microalgas, permite criar produtos de valor acrescentado a partir de resíduos da indústria, contribuindo com um impacto global positivo, para um futuro melhor.

É possível encontrar a tecnologia da A4F no mercado desde Março de 2009 e um bom exemplo da sua implementação é a cimenteira Secil, em Pataias. Além deste projecto a A4F implementou projectos de inovação e desenvolvimento, como o “ALGAPLEX - Produção contínua de microalgas mixotróficas com fixação de dióxido de carbono e azoto”, o projecto “GIAVAP” que tem como objectivo utilizar a engenharia genética para otimizar a produção de compostos de valor acrescentado e o “BIOFAT” que pretende demonstrar, em 4 anos, um *scale-up* de 10 hectares para cultivo de microalgas com uma produtividade da ordem das 100 toneladas por hectare.

Foi no sentido do desenvolvimento do estudo para um novo projecto que surgiu a oportunidade para se realizar esta dissertação.

### 2.2 Microalga do género *Arthrospira*

A *Arthrospira* é considerada o género mais importante de cianobactérias na indústria biotecnológica, sendo esta uma cianobactéria filamentosa e helicoidal que pode ser encontrada em vários ambientes, mas especialmente em climas tropicais e subtropicais, meios alcalinos e

salinos <sup>[7]</sup>. Esta preferência por ambientes salinos e de pH elevado é o segredo do seu sucesso em culturas monoalgais de larga escala ao ar livre, uma vez que o crescimento de outros microorganismos, incluindo outras espécies de microalgas, é normalmente inibido. É fotoautotrófica pelo que a intensidade da luz, a temperatura, a salinidade e a alcalinidade afectam o seu crescimento. No entanto, também pode desenvolver-se em cultivo mixotrófico e até heterotrófico <sup>[2]</sup>.

O seu cultivo em massa é relativamente simples e envolve apenas quatro fases: cultivo, colheita, secagem e empacotamento <sup>[2]</sup>.

Esta microalga é considerada uma das mais promissoras para a produção de diferentes bioquímicos, com elevado valor de mercado, em concentrações relativamente elevadas. É também reconhecida pelo seu desempenho quando usada na alimentação humana e animal, principalmente na aquacultura. Este desempenho notável prende-se com a sua composição única em vitaminas, ácidos gordos e proteína, sendo o seu conteúdo extraordinário nesta última. Assim, com o aumento da população humana e a consequente crescente necessidade de aumentar a produção de alimentos, a *Arthrospira* apresenta-se como uma potencial solução <sup>[7]</sup>.

No que respeita à sua composição, esta tipicamente não apresenta um elevado teor de lípidos, sendo estes cerca de 6 a 13 % do seu peso seco, dos quais aproximadamente metade são ácidos gordos essenciais. No entanto, a *Arthrospira* é a microalga com maior produção de ácido gama-linolénico (GLA), para além de conter sulfolípidos (indicados por terem actividade antiviral contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)). Relativamente a pigmentos, apresenta alguns carotenóides, sendo que a clorofila *a* é a única clorofila presente e varia entre cerca de 0,8 e 15 % em peso seco. O elevado conteúdo em proteínas, que pode variar entre cerca de 64 e 74 % do seu peso seco, é outro dos aspectos que tornam a *Arthrospira* um aditivo alimentar de elevado valor, sendo interessante para alimento animal e humano. Relativamente ao teor em hidratos de carbono, este não ultrapassa os 20 %, dos quais a grande maioria é solúvel em água. A *Arthrospira* apresenta também alguns aminoácidos, oito dos quais, essenciais e com percentagens que podem chegar aos 17 %. É sabido que apresenta um conteúdo relativamente elevado em vitamina B12, chegando aos onze miligramas por quilograma de peso seco. E pode ainda ser extraída, como produto secundário, a enzima superóxido dismutase pelo seu interesse terapêutico <sup>[7]</sup>. Existe um grande interesse num pigmento-proteína em particular, a Ficocianina, usada nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica. É ainda usada como marcador bioquímico em imunoensaios.

Além dos motivos acima referidos para o grande interesse no cultivo da *Arthrospira* existe ainda a sua função nutracêutica, como inibidor de replicação de alguns vírus como HIV-1, vírus da gripe A, herpes, entre outros [7].

O género *Arthrospira* compreende cerca de 35 estirpes, de entre as quais são frequentemente usadas para fins alimentares a *Arthorspira maxima* e a *Arthrospira platensis*.

Neste trabalho, começou-se por cultivar a *Arthrospira maxima* (SAG 84.79, da *Experimental Phycology and Culture Collection of Algae* da Universidade de Goettingen, Alemanha), espécie disponível no laboratório de microalgas do ISEP, e a seguir cultivou-se também a *Arthrospira platensis* (UTEX LB 2340, gentilmente facultada pela empresa A4F), sendo esta última, a espécie com a qual se deu continuidade ao trabalho de estudo da adaptação à salinidade.

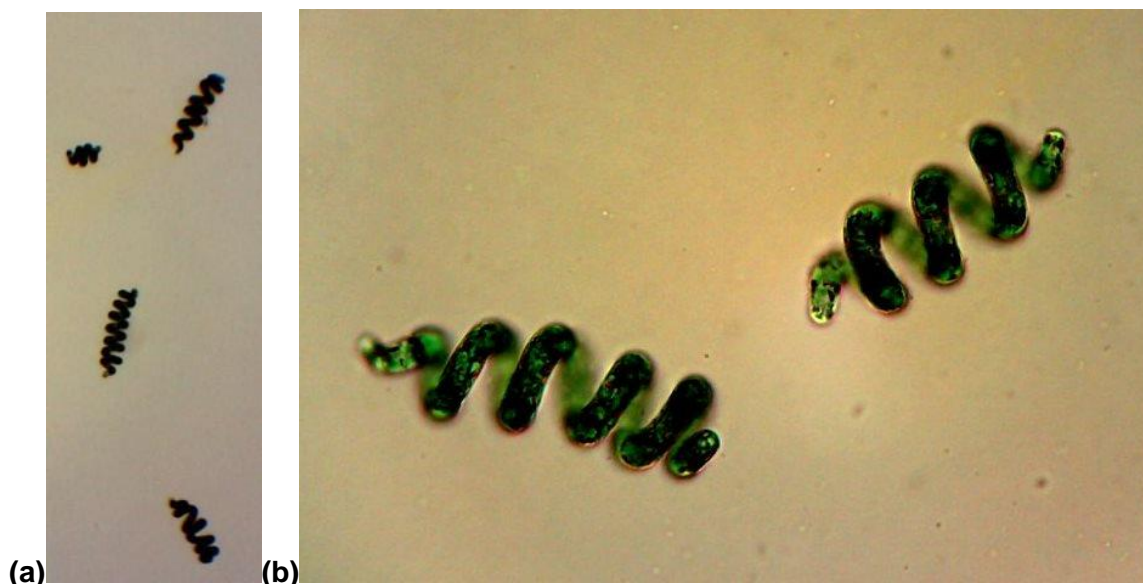
## 2.3 Características da *Arthrospira*: Classificação e Morfologia

### 2.3.1 Espécie: *Arthrospira platensis*; Estirpe: UTEX, LB 2340

A *Arthrospira platensis* UTEX LB 2340 usada neste trabalho é proveniente da algoteca da University of Texas at Austin, USA [9]. Esta é uma espécie de microalga da Filo *Cyanobacteria*, Família *Phormidiaceae* e Género *Arthrospira* [10]. Esta classificação de cianobactéria filamentosa resulta das suas semelhanças com a organização celular procariótica, característica de bactérias procarióticas. Esta espécie habita geralmente ambientes tropicais ou subtropicais, como África, Ásia e América do Sul, em meios líquidos com elevadas concentrações de carbonato e bicarbonato, onde o pH pode chegar a 11. Um bom exemplo do habitat natural desta espécie é o lago Chad [7].

A *Arthrospira* apresenta uma configuração filamentosa não ramificada, onde a característica morfológica fundamental do género é a disposição em hélice invertida constituída pela organização dos tricomas multicelulares cilíndricos de cor azul esverdeada. A sua divisão celular é por fissão binária [7].

Em seguida, na Figura 1, apresentam-se imagens obtidas com o auxílio de um microscópio óptico, onde se observa a estirpe *Arthrospira platensis* em estudo, com ampliações de 40x (imagem da esquerda) e 100x (imagem da direita).



**Figura 1** - Imagens de microscópio óptico com ampliação (a) 40x e (b) 100x, respectivamente, da *Arthrospira platensis* UTEX LB 2340.

## 2.4 Avaliação do Crescimento de Microalgas

Quando as condições são favoráveis ao crescimento e existe uma abundância de nutrientes, as microalgas crescem e multiplicam-se, resultando num aumento do tamanho e da biomassa das células ao longo do tempo. Assim, e a par da divisão celular ocorre um aumento da biomassa total [2].

De modo a que seja possível o estudo deste crescimento são atribuídos parâmetros de crescimento e feitas representações gráficas com a finalidade de revelar o desempenho das culturas [7].

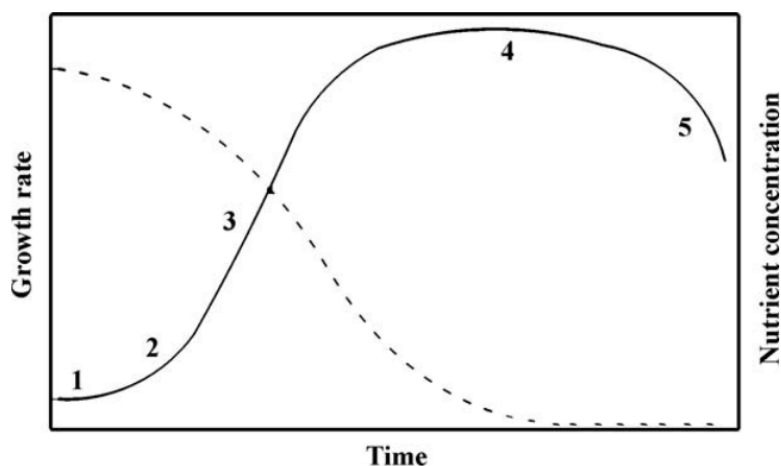
### 2.4.1 Curva de crescimento

Uma das representações gráficas é a curva de crescimento de microalgas (Figura 2), sendo que esta apresenta o incremento da biomassa ao longo do tempo.

Em culturas *batch*, a curva de crescimento apresenta cinco períodos:

- 1 - Fase de Indução ou Fase Lag:** Inicia-se com a inoculação da cultura. Não há aumento de biomassa, pois esta é uma fase de adaptação ao novo meio. É ainda possível que ocorra alguma diminuição da densidade celular;

- 2 - Fase Exponencial ou Fase Log:** Caracterizada pela duplicação de biomassa em intervalos regulares de tempo, esta fase exponencial de crescimento exhibe uma elevada velocidade de replicação;
- 3 - Fase de Diminuição do Crescimento Relativo ou Desaceleração:** Nesta fase há uma desaceleração no crescimento uma vez que o tempo da replicação aumenta. Esta quebra ocorre devido à diminuição da disponibilidade de nutrientes no meio (não há introdução de meio novo), pois foram consumidos pelas microalgas na fase Log. Esta diminuição deve-se também à redução da actividade fotossintética devido ao aumento da densidade da cultura na fase anterior, fazendo com que a energia luminosa que chega a cada microalga não seja a mesma que na fase Log.
- 4 - Fase Estacionária:** Nesta etapa não há aumento nem diminuição da densidade da cultura, isto é, a velocidade de crescimento contrabalança a velocidade de morte de microalgas;
- 5 - Fase de Morte da Cultura:** Com o passar do tempo e o aumento do número de indivíduos há um esgotamento de nutrientes, há uma maior diminuição da energia luminosa que chega até cada indivíduo e um aumento de produtos tóxicos no meio, resultantes da actividade metabólica das microalgas. Todos estes factores contribuem para a morte da cultura e consequente diminuição da biomassa.



**Figura 2** - Curva de crescimento de uma cultura microalgal em reactor batch (linha a cheio) e decréscimo de nutrientes (linha tracejada) <sup>[1]</sup>.

## 2.4.2 Parâmetros de Avaliação do Crescimento

Os parâmetros mais usados para avaliação do crescimento de uma cultura são a densidade celular máxima, o tempo de duplicação e a velocidade específica de crescimento.

Para a análise do crescimento de microalgas em culturas *batch* aplica-se o modelo logarítmico de regressão, visto não existir um modelo característico do crescimento microalgal. Desta forma, este modelo apenas é aplicável até à etapa de desaceleração do crescimento relativo, não estando esta incluída <sup>[7]</sup>.

A densidade celular máxima é o valor mais elevado do número de células por unidade de volume num determinado tempo de cultivo. O tempo de cultivo refere-se ao tempo decorrido desde a inoculação até ao momento em que a cultura atingiu a densidade máxima.

Em condições habituais de crescimento, a velocidade de crescimento específica ( $\mu$ ) para microalgas pode ser dada pela equação <sup>[7]</sup>:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Onde  $x_1$  e  $x_2$  representam as concentrações da biomassa no instante de tempo  $t_1$  e  $t_2$ , respectivamente.

Esta velocidade de crescimento específica pode ainda ser relacionada, a partir da equação que se segue, com o tempo de duplicação ( $t_d$ ), também designado de tempo de geração ( $g$ ), de uma cultura <sup>[7]</sup>.

$$g = t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} = \frac{0,6931}{\mu} \quad (2)$$

## 2.5 Meio de cultura

### 2.5.1 Fontes nutricionais

Para a preservação e cultivo de microalgas existem vários meios de cultura apropriados para os diferentes requisitos de cada espécie. Normalmente, em cultivos massivos de microalgas de água doce os nutrientes fundamentais são o carbono, o azoto e o fósforo. Já no caso de meios salinos, há um aumento na concentração de magnésio e de sódio relativamente ao anterior.

Estes meios podem ter origem em efluentes urbanos ou industriais quando as culturas são à escala industrial, sendo primeiramente analisados quimicamente, ou preparados a partir de sais de elevada pureza e de água destilada, desionizada ou filtrada por membrana, para escalas laboratoriais [2].

O carbono é o macronutriente principal uma vez que representa uma fracção considerável na composição da biomassa e desempenha um papel fundamental no processo de fotossíntese ( $\text{CO}_2$ ) no regime autotrófico, mas é também essencial no regime heterotrófico (compostos orgânicos) e no regime mixotrófico, onde se faz uso de compostos orgânicos e de uma fonte luminosa. Este elemento tem também outras funções no cultivo de microalgas, como por exemplo no controlo do pH, pois constitui o tampão mais importante habitualmente presente em águas doces em cultivos de espécies em massa. Este macronutriente tem de ser fornecido ao meio de cultivo, uma vez que, ao contrário das plantas, o  $\text{CO}_2$  atmosférico não está facilmente disponível para as microalgas devido à sua baixa taxa de difusividade em água.

O azoto é o nutriente mais relevante, depois do carbono e está normalmente disponível em excesso no meio. É importante no desenvolvimento das microalgas uma vez que é um elemento fundamental para a estrutura das proteínas necessárias ao metabolismo das mesmas. Representa entre 1 e mais de 10 % da composição da biomassa e esta percentagem varia mesmo dentro da mesma espécie. A falta de azoto provoca descoloração (redução da concentração de clorofila) e acumulação de compostos orgânicos.

Apesar de o fósforo ser responsável apenas por 1 % da composição das microalgas, é um elemento essencial para o crescimento e para os processos celulares das microalgas. A disponibilidade deste elemento no meio é facilmente afectada, visto que este nutriente se liga facilmente a outros iões existentes no meio, precipitando. O fósforo é ainda responsável pela composição da biomassa produzida, afectando a produção de lípidos e hidratos de carbono.

A quantidade de sal presente num meio pode ter, dependendo da sua concentração, duas funções. Isto é, pode ser usada como origem de *stress*, influenciando a composição da biomassa da cultura, assim como pode ter a função de prevenir contaminações na cultura por outros organismos ou mesmo por outras microalgas indesejadas.



## 2.5.2 Processo de cultivo

### 2.5.2.1 Critérios químicos e físicos de cultivo

O sucesso do cultivo de microalgas depende de factores como a qualidade e intensidade da luz que chega às células, a agitação do meio/arejamento, a temperatura, o pH, presença de químicos tóxicos, salinidade, concentração de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e nutrientes <sup>[1]</sup>.

A luz é o factor central no que diz respeito ao cultivo em massa, pois é uma das principais fontes de energia para a produção de biomassa. No entanto, o bom desempenho da sua função encontra-se dependente de outros factores como a agitação, a produtividade fotossintética das células, a densidade da cultura, a dissipação sob a forma de calor e por reflexão, as propriedades ópticas das células, entre outros. Apesar de ser essencial pode também ter um efeito nocivo, isto é, o excesso de luz pode levar à foto-oxidação <sup>[2]</sup>.

A agitação ou arejamento do meio líquido promove a suspensão das células no meio impedindo que estas se depositem no fundo do reactor, beneficiando a homogeneização da cultura e consequentemente uniformizando o acesso de todas as células à luz, ao calor, aos metabolitos e aos nutrientes, mas também facilitando a transferência de gases.

A seguir à luz, a temperatura é o factor de maior importância no desenvolvimento de biomassa. Pode também influenciar a composição da mesma. Normalmente as microalgas conseguem tolerar temperaturas 15 °C inferiores à sua temperatura óptima, no entanto 2 a 4 °C superiores à sua temperatura óptima seria o suficiente para haver uma perda total da cultura.

### 2.5.3 Sistemas de cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos ou fechados. Sendo que os sistemas abertos são tanques que podem assumir diferentes formatos (ex. em “*raceway*” ou cascata) e os sistemas fechados são normalmente chamados de fotobioreactores, também estes com diferentes formatos (ex. tubulares ou placas). Estes últimos requerem um maior investimento na sua construção e possuem maiores custos operacionais do que os sistemas abertos, sendo também menos duradouros e com menor capacidade de produção. No entanto, os sistemas abertos estão sujeitos às condições atmosféricas, têm maior custo para garantir a homogeneização da cultura, são menos flexíveis, ocupam maior área, são mais susceptíveis a contaminações e a altura máxima de água recomendada é de aproximadamente 15 cm <sup>[1]</sup> para que a fotossíntese ocorra mesmo nas células localizadas a maior profundidade (Tabela 1).

Estes sistemas podem operar em *batch* (descontínuo), *fed-batch* (semi-contínuo) e em contínuo.

Para cultivo em reactor *batch* são necessárias as seguintes fases:

- 1) Preparação do meio de cultura específico para a estirpe a ser desenvolvida, assim como para a produção da composição da biomassa desejada;
- 2) Inoculação do meio de cultura, cujo inóculo deverá derivar de uma cultura microalgal mais densa; Desenvolvimento da cultura até à fase de crescimento linear ou até à fase necessitada para extracção dos compostos desejados;
- 3) Quando a cultura atingir a fase requerida procede-se à colheita total e à obtenção do(s) produto(s).

**Tabela 1** - Comparação do cultivo em massa de microalgas em sistemas abertos e fechados <sup>[1]</sup>.

Culture systems for microalgae	Closed systems (PBRs)	Open systems (Ponds)
Contamination control	Easy	Difficult
Contamination risk	Reduced	High
Sterility	Achievable	None
Process control	Easy	Difficult
Species control	Easy	Difficult
Mixing	Uniform	Very poor
Operation regime	Batch or semi-continuous	Batch or semi-continuous
Space required	A matter of productivity	PBRs ~ Ponds
Area/volume ratio	High (20–200 m <sup>-1</sup> )	Low (5–10 m <sup>-1</sup> )
Population (algal cell) density	High	Low
Investment	High	Low
Operation costs	High	Low
Capital/operating costs ponds	Ponds 3–10 times lower cost	PBRs > Ponds
Light utilization efficiency	High	Poor
Temperature control	More uniform temperature	Difficult
Productivity	3–5 times more productive	Low
Water losses	Depends upon cooling design	PBRs ~ Ponds
Hydrodynamic stress on algae	Low–high	Very low
Evaporation of growth medium	Low	High
Gas transfer control	High	Low
CO <sub>2</sub> losses	Depends on pH, alkalinity, etc.	PBRs ~ Ponds
O <sub>2</sub> inhibition	Greater problem in PBRs	PBRs > Ponds
Biomass concentration	3–5 times in PBRs	PBRs > Ponds
Scale-up	Difficult	Difficult

Este modo de cultivo pode ainda ser adaptado para *fed-batch*, simplesmente fazendo a adição periódica de meio fresco até ao término do cultivo. Outro ponto onde o método semi-contínuo

difere do descontínuo é no acto de colheita, em que este não corresponde ao fim do processo e é, neste momento, colocado um volume de meio fresco equivalente ao volume da colheita. A cultura que permanece no reactor funciona como inóculo para a fase seguinte.

No processo contínuo há uma entrada ininterrupta de meio fresco que compensa o caudal de saída da biomassa colhida continuamente, de modo a que o volume do líquido no reactor se mantenha constante. A finalidade é atingir o estado estacionário do sistema e manter a cultura com uma densidade de biomassa sensivelmente constante, de maneira a que se recolha constantemente os produtos desejados.

#### **2.5.4 Métodos de colheita**

Para a produção de produtos de valor acrescentado ou produtos para a alimentação, é indispensável separar a biomassa do meio de cultura, o que pode chegar a 30 % dos custos totais de produção da biomassa <sup>[1]</sup>. O processo pode conter uma ou mais etapas químicas, biológicas ou físicas de separação sólido-líquido. São exemplos de métodos de colheita a sedimentação, a centrifugação, a floculação, a filtração e a ultrafiltração.

Para diminuir significativamente a percentagem de humidade presente na biomassa existem ainda dois métodos adicionais a secagem ao sol ou a desidratação, caso seja necessário para obtenção do produto final.

A fase seguinte contempla a extracção dos compostos. Nesta etapa as paredes celulares das microalgas são rompidas por utilização de métodos físicos como os ultra-sons, enzimas, choque osmótico e solventes. Apresentam-se, em seguida, alguns dos métodos referidos:

- Extracção por solventes: Aplica-se na extracção do óleo das microalgas, podendo ser usados produtos químicos simples ou combinados entre si, como: etanol, metanol, hexano, n-hexano, clorofórmio, ou combinação de solventes em diversas proporções volumétricas, como 2:1 clorofórmio:metanol; 2:2:1,8 clorofórmio:metanol:água; 7:3 metanol:água. Após a extracção, o óleo e a polpa remanescente são separados por centrifugação, por exemplo, e o solvente é recuperado por destilação.
- Extracção enzimática: As enzimas são usadas para degradar a parede celular das microalgas, o que facilita a migração do conteúdo das células para o meio aquoso;

- Choque osmótico: A redução repentina da pressão osmótica possibilita a ruptura das paredes das células das microalgas. Este processo é usado para extrair o óleo e proteínas;
- Extração por ultrassons: As bolhas de cavitação formadas na fronteira microalga – solvente rebentam e, como estão perto das paredes da célula, geram ondas de choque e jatos líquidos que originam a ruptura da parede celular e a libertação dos conteúdos celulares para o solvente.



### 3. Descrição Técnica

Neste capítulo será feita a descrição técnica do trabalho realizado, apresentados e discutidos os principais resultados.

#### 3.1 Objectivos e Procedimentos Genéricos

O trabalho realizado tem como objectivo adaptar e otimizar o desenvolvimento da microalga *Arthrospira platensis*, em Portugal, a um meio com uma concentração de sal muito próxima da salinidade do mar (35,5 g/l), para posterior aplicação numa biorrefinaria, com vista à obtenção de produtos para a indústria alimentar e cosmética, entre outras.

Inicialmente retirou-se uma amostra de uma cultura de *Arthrospira maxima* (SAG 84.79), disponível no Laboratório de Microalgas do ISEP, e que serviu de inóculo para um matraz de 1 l de meio de cultura Zarrouk <sup>[12]</sup>, a partir do qual seriam retirados os inóculos para os estudos a desenvolver. Assim que esta cultura se tornou visualmente densa (verde azulado escuro), foi transferida para um matraz de 5 l. Desta cultura foram retiradas amostras para fazer a avaliação do comprimento de onda ao qual se observava maior absorvância num espectrofotómetro UV-Vis e para se proceder à determinação da curva de calibração absorvância vs concentração de biomassa seca, para esta microalga.

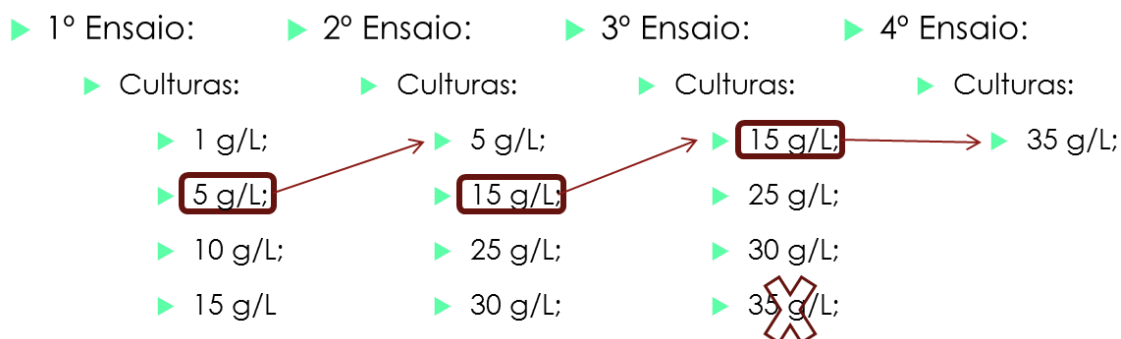
Mais tarde foi necessário, a partir de uma amostra cedida pela empresa A4F, criar uma cultura densa de *Arthrospira platensis* (UTEX LB 2340), num matraz de 1 l, adaptada às condições laboratoriais disponíveis e ao meio de cultura Zarrouk com 1 g/l de sal. Esta serviu como cultura mãe para começar o primeiro ensaio e foi posteriormente transferida para um matraz de 5 l. Desta cultura foram também retiradas amostras para fazer a avaliação do comprimento de onda ao qual se observava maior absorvância num espectrofotómetro UV-Vis e para se proceder à determinação da sua curva de calibração absorvância vs concentração de biomassa seca.

Para se atingir os 35,5 g/l de sal no meio de cultura, em pouco tempo, foi necessário dividir o trabalho em 4 ensaios de concentrações de sal crescentes com duração de cerca de 2 semanas cada um.

Os 4 ensaios foram realizados de acordo com o seguinte procedimento:

1. Ensaio número 1 as concentrações de sal de 1, 5, 10 e 15 g/l. O inóculo usado no primeiro ensaio foi obtido a partir de uma cultura em meio Zarrouk suplementado com 1 g/l de glicose e com 1 g/l de sal.
2. Ensaio número 2 as concentrações de sal de 5, 15, 25 e 30 g/l. O inóculo usado para o segundo ensaio foi retirado de uma cultura do primeiro ensaio, obtido de uma cultura em meio Zarrouk suplementado com 1 g/l de glicose e com 5 g/l de sal
3. Ensaio número 3 as concentrações de sal de 15, 25, 30 e 35 g/l. O inóculo usado no terceiro ensaio foi retirado de uma cultura do segundo ensaio, obtido de uma cultura em meio Zarrouk suplementado com 1 g/l de glicose e com 15 g/l de sal.
4. No ensaio número 4 foi repetida a concentração de sal de 35 g/l. O inóculo usado no quarto ensaio foi retirado de uma cultura do terceiro ensaio, mas com a mesma concentração do inóculo retirado do ensaio número 2, e que foi usado no ensaio número 3, a fim de replicar as mesmas condições do ensaio 3, obtido de uma cultura em meio Zarrouk suplementado com 1 g/l de glicose e com 15 g/l de sal. Este ensaio foi realizado apenas para essa concentração de sal, porque ocorreu um erro nessa mesma concentração no ensaio número 3.
5. Todos os ensaios para cada uma das concentrações foram feitos em triplicado em matrizes de 500 ml.

Na imagem da Figura 3 apresenta-se um esquema com as culturas realizadas em cada um dos 4 ensaios, e a vermelho encontram-se assinaladas as culturas usadas como inóculo do ensaio seguinte.



**Figura 3** - Esquema exemplificativo dos ensaios, culturas e inóculos usados.

### 3.2 Parâmetros físicos fixados

Para que as condições experimentais fossem bem controladas foram definidos alguns critérios, como os parâmetros físicos que foram fixados, ou seja, foram mantidos no decorrer dos 4 ensaios. Estes parâmetros foram:

- Temperatura ambiente:  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ;
- Fonte de energia luminosa: lâmpada fluorescente branca/fria;
- Intensidade luminosa:  $30\text{ }\mu\text{moles m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  ou 2220 lux;
- Fotoperíodo: 12 horas de luz, 12 horas de escuro (12:12);
- Arejamento: 0,66 l/h de Ar;

### 3.3 Inoculação da *Arthrospira platensis*

O ensaio do desenvolvimento das microalgas inicia-se pela inoculação da espécie em estudo a partir da cultura preparada com o inóculo cedido pela empresa A4F. Foi necessário aguardar que esta cultura ficasse densa antes de começar os ensaios, uma vez que o inóculo foi submetido a condições de temperatura e luz diferentes e foi inoculado num meio novo e diferente daquele em que estava habitualmente nas instalações da A4F. A estirpe usada é a *Arthrospira platensis* UTEX LB 2340, proveniente da algoteca da University of Texas at Austin, USA. O meio base onde se realizou o cultivo é designado de Zarrouk <sup>[12]</sup> modificado.

#### 3.3.1 Material utilizado no cultivo

Todo o material usado nos vários ensaios foi cuidadosamente escolhido com as mesmas características de modo a que não houvessem pequenas variações nas condições de cultivo.

1. O material usado (provetas, matrizes, seringas, gobelés, tubos de vidro para o arejamento, rolhas, tubagens de silicone, entre outros) foi lavado com água e detergente, passado por água abundante, seco, devidamente preparado para autoclavar e finalmente autoclavado a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 20 minutos em autoclave (Memmert).
2. Para tapar os matrizes permitindo trocas gasosas foram feitas rolhas de gaze e algodão hidrofóbico, que foram autoclavadas dentro dos próprios matrizes e tapadas por folha de alumínio.



### 3.3.2 Condições de Cultivo

A inoculação do meio foi executada no interior de uma câmara de fluxo laminar (CRUMA) e o cultivo foi realizado numa sala climatizada, em bancadas onde a iluminação provinha de lâmpadas fluorescentes brancas, posicionadas na horizontal e perpendicularmente às bancadas (Figura 4).

1. A energia luminosa foi medida com um luxímetro e foram marcadas na bancada 14 posições (para os 14 matrizes) onde os matrizes recebessem 2220 lux. Foi fixado o fotoperíodo em 12 horas, controlado por um temporizador automático.
2. A sala climatizada foi mantida a uma temperatura de aproximadamente  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , por um aparelho de ar condicionado.
3. O arejamento para os 14 matrizes foi produzido por um sistema de uma bomba de ar (BOYU), em funcionamento 24 horas por dia, e três distribuidores com cinco saídas reguláveis.



**Figura 4** - Condições de cultivo: matrizes inoculados, lâmpadas, arejamento e bancada.

Na Figura 5 é possível observar a disposição das culturas de acordo com as marcas para 2220 lux. Para garantir uma distribuição uniforme da quantidade de energia luminosa nas culturas, todos os dias os matrizes trocavam de lugar entre si.



**Figura 5** - Distribuição dos matrizes na bancada, segundo a uma curva de igual intensidade luminosa.

### 3.3.3 Meio de cultura padrão – Zarrouk modificado

O meio de cultura padrão usado nos ensaios foi o Zarrouk <sup>[12]</sup> modificado, com a composição indicada na **Error! Reference source not found.**

Na Tabela 2 apresenta-se a sua composição em reagentes e quantidade dos mesmos para cada litro de meio final, assim como a informação necessária para preparar uma solução concentrada deste meio, para posterior diluição.

Na preparação do meio todos os reagentes foram pesados numa balança digital (OHAUS Pioneer TM Sr1-05 PA4 13C) com precisão  $\pm 5 \times 10^{-4}$  g. Os reagentes foram dissolvidos em água destilada com recurso a uma placa de aquecimento e agitação magnética (Labinco L-82), num balão volumétrico. Assim que a mistura estava completa o meio era transferido para frascos de vidro *Schott*, para posteriormente serem autoclavados nas mesmas condições do restante material, anteriormente referidas.

O pH do meio padrão Zarrouk modificado final é  $8,90 \pm 0,15$ .

**Tabela 2** - Composição do meio de cultura padrão de *Arthrospira platensis* – Zarrouk modificado

Reagente		Massa (g/l <sub>final</sub> )	Massa (g/l <sub>conc</sub> )	Volume (ml <sub>conc</sub> /l <sub>final</sub> )	[Elemento] (ppm)	
					Elemento	(mg/l)
Macronutrientes	NaHCO <sub>3</sub>	16,8	_____	_____	C	2.285,70
					Na	4.381,00
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2	50	40	C	226,4
					Na	867,9
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	25	20	P	89
					K	224,5
	NaNO <sub>3</sub>	2,5	50	50	N	411,8
					Na	676,5
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	50	20	S	184,2
					K	448,7
	NaCl	1	50	20	Na	393,2
					Cl	606,8
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	20	10	S	26,1
					Mg	19,7
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04	4	10	Ca	10,9
					Cl	19,3
EDTA-Na <sub>2</sub>	0,08	40	2	C	25,8	
				N	6	
				Na	98,9	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01	5	2	Fe	2	
				S	1,2	
Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00286		1	B	2,86
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,000222			Zn	0,222
					S	
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00181			Mn	1,81
					S	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,000079			Cu	0,079
					S	
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,000044			Co	0,044
N						
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,000018	Mo	0,018			
		Na				
H <sub>2</sub> O	_____	_____	_____	825		

### 3.3.4 Solução de glicose concentrada

Para que o cultivo fosse realizado em regime mixotrófico foi preparada uma solução concentrada de glicose (250 g/l) para cada ensaio, a qual foi também autoclavada nas mesmas condições referidas anteriormente para o material. Desta solução foi retirado um volume de 2 ml e colocado em cada matraz com cultivo de microalgas.

### 3.3.5 Controlo de contaminações

A observação de possíveis contaminações das culturas, desde a cultura mãe até ao último ensaio, foi efectuada por controlo visual ao microscópio.

## 3.4 Curva de crescimento

### 3.4.1 Construção da curva de calibração

No anexo 1 encontra-se a curva de calibração – *Abs vs [biomassa seca (g/l)]*. Esta curva foi traçada para o regime de crescimento autotrófico para a microalga *Arthrospira platensis*, de acordo com o seguinte procedimento:

1. Cultivo da microalga até à fase estacionária, em que existe uma cultura densa em matraz de 5 l;
2. Colheita da biomassa húmida - adição de aproximadamente 6 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 40 %, após algum tempo retirar a maior parte do sobrenadante e colocar a biomassa obtida numa centrífuga durante 20 minutos a 3500 rpm, rejeitar o sobrenadante;
3. Liofilização da biomassa colhida (procedimento facultado pela Universidade do Porto – Faculdade de Engenharia);
4. Pesagem de diferentes quantidades de biomassa liofilizada na balança anteriormente referida, para preparar 12 soluções padrão de diferentes concentrações.
5. Leitura das absorvâncias das 12 soluções de concentração conhecida a 682 nm (comprimento de onda ao qual se observa o pico de absorvância máxima). As leituras foram efectuadas em triplicado e num espectrofotómetro UV-Vis (DR2800 HACH Lange).

### 3.4.2 Avaliação do crescimento

Foram realizados três conjuntos de ensaios, em matrizes de 500 ml, nos quais se fizeram variar as concentrações de sal no meio:

1. Em cada ensaio foi feito, para controlo, um branco apenas com meio e um branco com meio e inóculo;
2. Em cada ensaio foram feitas quatro culturas (em triplicado) de concentrações distintas e crescentes de sal em regime mixotrófico. Este regime foi obtido por adição 1,0 g/l de carbono orgânico, sob a forma de glicose;

Todas as culturas foram realizadas em triplicado, sendo que as do primeiro ensaio foram inoculadas com 100 ml de inóculo proveniente da solução mãe referida anteriormente. O inóculo do segundo ensaio era proveniente da cultura com suplemento de 5 g/l de sal do primeiro ensaio e o volume usado foram 50 ml. E o inóculo do terceiro ensaio era proveniente da cultura com suplemento de 15 g/l de sal do segundo ensaio e o volume usado foram 11 ml. Foram usados diferentes volumes de inóculo nos diferentes ensaios para garantir que todos os ensaios partiriam da mesma concentração de biomassa (inóculo).

A avaliação do crescimento foi realizada diariamente em matrizes alternados, uma vez que a cultura era de apenas 500 ml. Assim, no primeiro dia era realizada a avaliação de todos os triplicados número 1 de cada concentração, no segundo dia era realizada a avaliação dos triplicados número 2, no terceiro dia os triplicados número 3, voltando aos triplicados número 1 no quarto dia e assim sucessivamente.

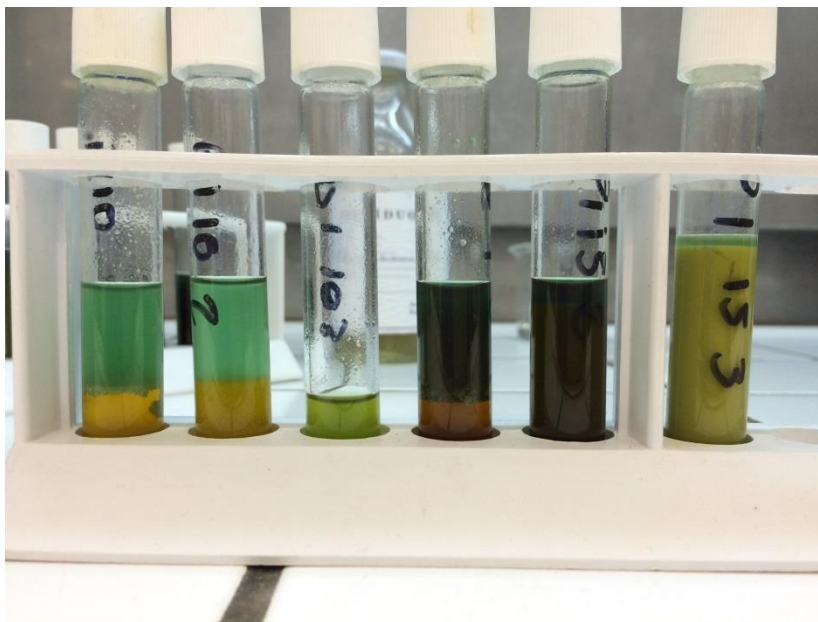
A avaliação efectuada foi a leitura da absorvância por espectrofotometria UV-Vis diariamente, e no final dos ensaios era controlado o pH. Para cada leitura era retirado um volume de 4 ml de cada matraz.

### 3.4.3 Cálculo da concentração de biomassa produzida

A determinação da concentração de biomassa para os três ensaios, referidos anteriormente, foi realizada com base na curva de calibração *Abs vs [biomassa seca]* (g/l), obtida para o regime de crescimento autotrófico (ver 3.4.1 e Anexo 1). Os valores destes ensaios podem ser encontrados no Anexo 2.

### 3.5 Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria

Cada ensaio teve a duração de 2 semanas, excepto o segundo ensaio, uma vez que a última semana deste ensaio coincidiu com o período festivo do Natal e Ano Novo, fazendo com que este ensaio fosse prolongado por mais 7 dias. Não foi possível aguardar que as culturas chegassem ao estado estacionário visto que o tempo disponível para a realização dos 3 ensaios era escasso.



**Figura 6** - Extracção de lípidos da biomassa microalgal.

A avaliação do crescimento microalgal nos três ensaios terminava após o final das 2 semanas de cultivo. A biomassa era colhida recorrendo ao mesmo processo descrito em 3.4.1, catalogada e armazenada numa arca congeladora ( $-20 \pm 5$  °C). Seguidamente a biomassa era liofilizada (como descrito em 3.4.1).

Sobre a biomassa liofilizada foram realizados alguns ensaios para a sua caracterização, como a extracção de lípidos por solventes e respectiva quantificação por gravimetria (Figura 6). A extracção foi realizada com uma mistura de clorofórmio:metanol:água (2:2:1,8 em volume), de acordo com um procedimento ajustado a partir do método de Bligh e Dyer <sup>[13]</sup> e descrito no Anexo 3.

### 3.6 Determinação do Teor de Azoto Kjeldahl

Outro ensaio realizado sobre a biomassa microalgal liofilizada foi a determinação do teor de azoto Kjeldahl. Este trabalho é realizado em 3 etapas, sendo a primeira a digestão da amostra, seguida pela destilação da amostra digerida e finalmente uma etapa de titulação com ácido clorídrico.



**Figura 7** - Destilação para a determinação do teor de Azoto Kjeldhal

A etapa de digestão foi realizada com o auxílio do digestor de amostras de 6 postos (RAYPA) e com recurso ao destilador para a determinação de azoto Kjeldahl e azoto amoniacal (DNP 1500 RAYPA).

Os procedimentos usados nesta determinação podem ser consultados no Anexo 4.

Posteriormente a partir do teor de azoto Kjeldhal foi possível estimar a percentagem de proteína existente na biomassa microalgal de acordo com o Factor de Azoto-para-Proteína em microalgas <sup>[14]</sup>. Este factor é 5,95 para microalgas e cianobactérias em geral <sup>[15]</sup>.

## 4. Resultados e Discussão

A *Arthrospira platensis* UTEX LB 2340 foi cultivada em laboratório, para avaliar a sua taxa de crescimento e a biomassa resultante foi caracterizada em termos de componentes principais (lípidos, hidratos de carbono e proteínas) visando a sua aplicação numa biorefinaria.

Neste estudo foram adicionadas, progressivamente, porções crescentes de NaCl (5, 10, 15, 25, 30 e 35 g/l), sendo que o objectivo seria o de igualar a concentração de sal da água do mar. Neste caso em particular, foi usado como referência o oceano Atlântico com 35,5 g/l <sup>[11]</sup>.

As condições de salinidade foram criadas em simultâneo com condições mixotróficas (por adição de 1,0 g/l de glicose ao meio de cultura), em comparação com as suas condições padrão autotróficas em meio Zarrouk sem salinidade.

### 4.1 Monitorização de possíveis contaminações

O controlo de possíveis contaminações das culturas desde a cultura mãe até ao último ensaio foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Na Figura 1 apresentam-se duas imagens de microscópio óptico da estirpe estudada, sem contaminações. De modo a monitorizar possíveis contaminações, todas as culturas foram verificadas semanalmente. Até ao final dos ensaios não se verificaram qualquer tipo de contaminantes biológicos, como era de esperar devido à presença de uma concentração considerável de NaCl no meio de cultura.

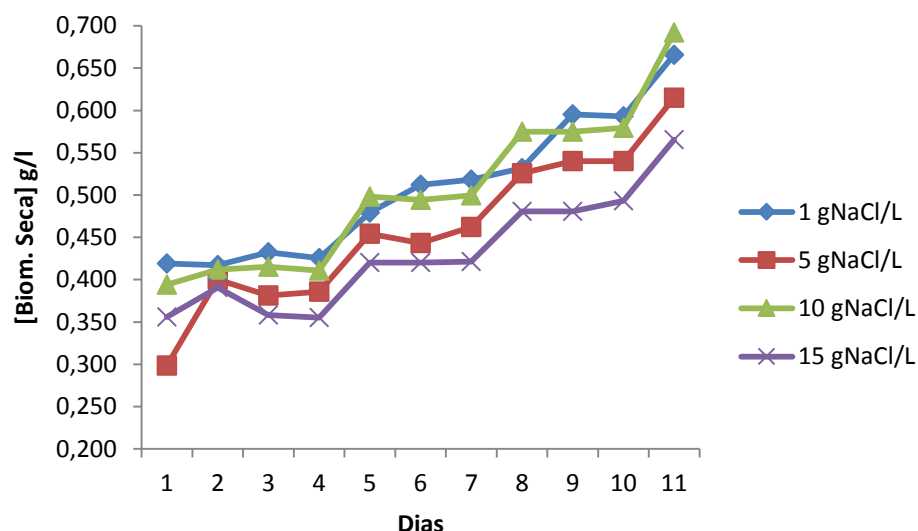
### 4.2 Avaliação do crescimento da *Arthrospira platensis*

A avaliação do crescimento microalgal para os quatro ensaios, nos quais se variaram as concentrações de NaCl no meio foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 3.4.2. Uma vez que as leituras foram feitas diariamente e em matrizes alternados, na mesma cultura, os triplicados 1, 2 e 3 correspondem respectivamente aos dias 1, 2 e 3, sendo que no quarto dia volta-se ao triplicado número 1 e assim sucessivamente, para poder ser observada uma evolução contínua de cada cultura.



#### 4.2.1 Ensaio 1

Na Figura 8 apresentam-se as curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs *dias* de cultivo do primeiro ensaio. O crescimento foi realizado em regime mixotrófico com meio de cultura Zarrouk modificado, com diferentes concentrações de sal e adição de 1,0 g/l de glicose.



**Figura 8** - Curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs tempo, do primeiro ensaio

Da Figura 8 conclui-se que a adição de sal ao meio faz diminuir a concentração da biomassa desde o primeiro dia do cultivo e o aumento da concentração de sal no meio provoca uma maior diminuição de produtividade de biomassa, como seria de esperar. No entanto houve um bom desenvolvimento, após a etapa de adaptação que terminou no quarto dia de ensaio (Figura 9). Nesta fase de adaptação foi possível observar uma mudança de tonalidade nas culturas de maior concentração (15 g/l) de sal neste ensaio e alguma turvação, tal como é possível observar na Figura 10.



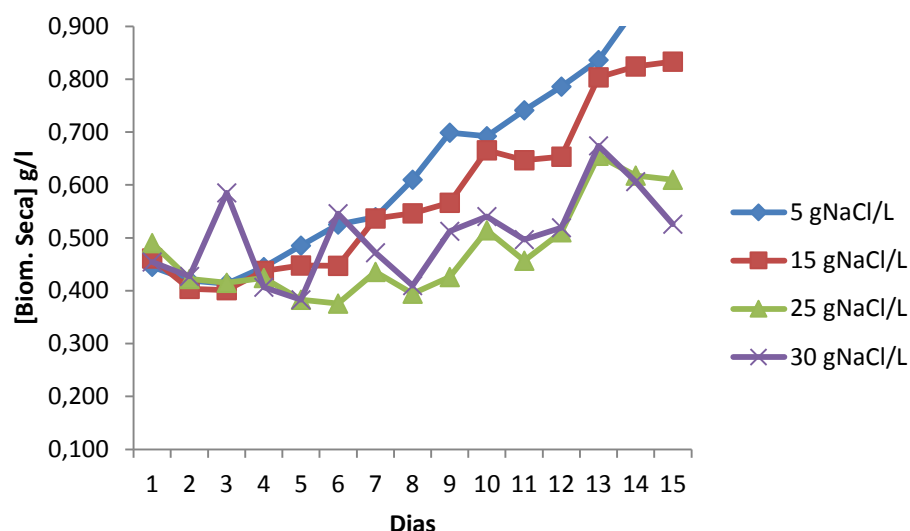
**Figura 9** - Culturas de *Arthrospira platensis* em regime mixotrófico com 1,0 g/l de glicose, no primeiro ensaio



**Figura 10** - Culturas de *Arthrospira platensis* de 15 g NaCl/l, na fase de adaptação, no primeiro ensaio

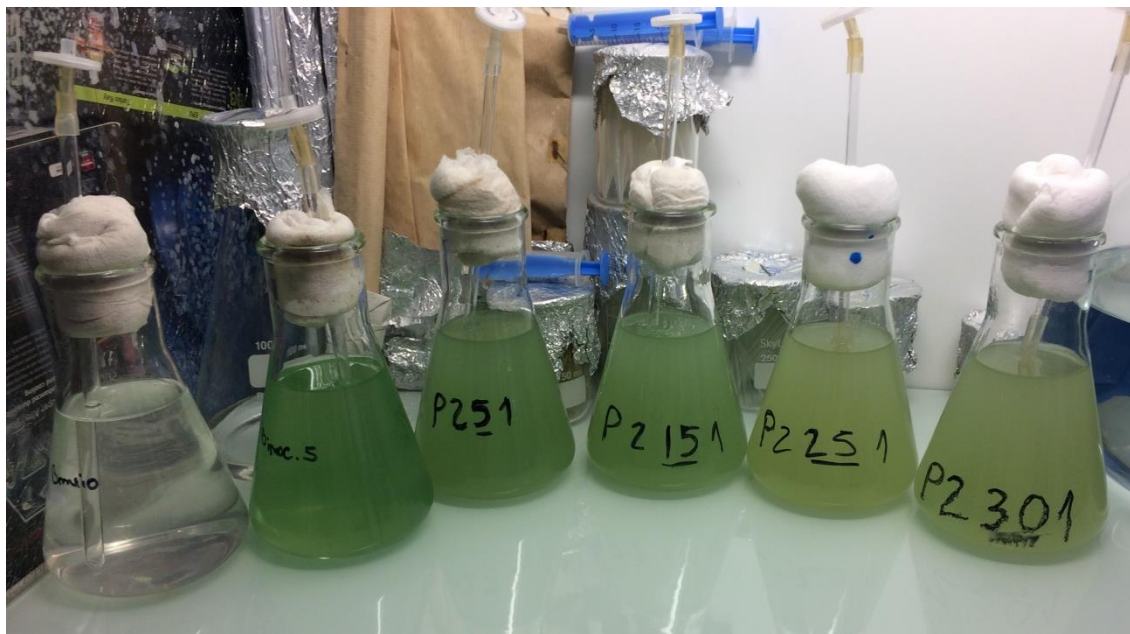
#### 4.2.2 Ensaio 2

Na Figura 11 apresentam-se as curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs *dias* de cultivo do segundo ensaio. O crescimento foi realizado em regime mixotrófico com meio de cultura Zarrouk modificado, com diferentes concentrações de sal e adição de 1,0 g/l de glicose.



**Figura 11** - Curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs tempo, no segundo ensaio

Conclui-se, a partir da análise da Figura 11, que a cultura com adição de sal a 5 g<sub>NaCl</sub>/l se desenvolveu melhor que as restantes, após a fase de adaptação, o que está de acordo com o esperado, uma vez que esta cultura estava à mesma concentração de sal do inóculo deste ensaio. Isto é, as microalgas já se tinham habituado a um meio com uma concentração de sal de 5 g/l e por esse motivo o seu desenvolvimento foi melhor que as restantes. A cultura seguinte que se desenvolveu melhor, pelas mesmas razões da anterior, foi a que menor concentração de sal tinha, 15 g<sub>NaCl</sub>/l, das restantes 3. As outras duas tiveram uma menor produtividade de biomassa ao longo do ensaio, uma vez que a concentração de sal era 5 e 6 vezes superior à do inóculo.



**Figura 12** - Culturas de *Arthrospira platensis* na fase de adaptação, no segundo ensaio

Na Figura 12 é possível observar mudança de tonalidade e alguma turvação na fase de adaptação das culturas no início do ensaio 2, como também se havia verificado no ensaio 1. Após esta fase, houve um bom desenvolvimento que terminou no quarto dia de ensaio para as culturas de 5 e 15 g<sub>NaCl</sub>/l e no oitavo dia de ensaio para as restantes (Figura 13).

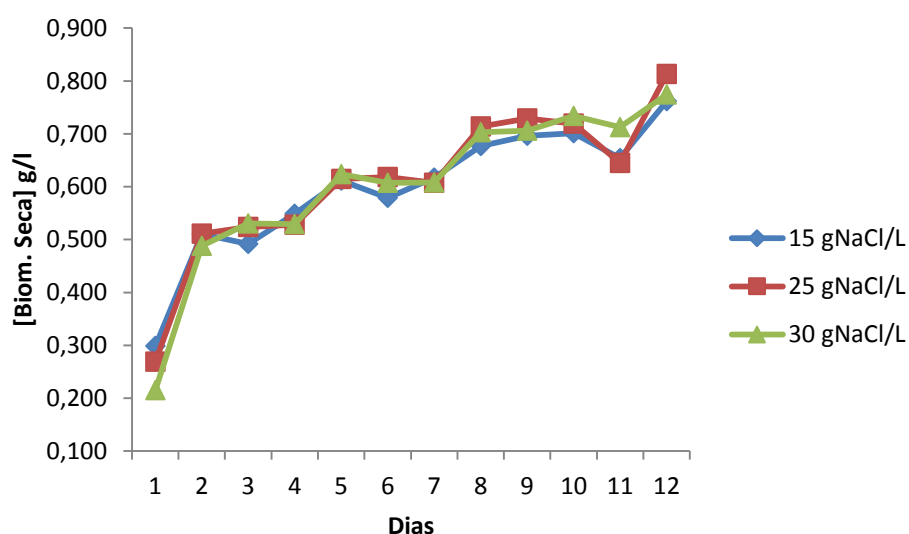


**Figura 13** - Culturas de *Arthrospira platensis* em regime mixotrófico com 1,0 g/l de glicose, no segundo ensaio e após a fase de adaptação

Na Figura 13 já é possível verificar o erro na cultura P2 30 3, a qual estava amarela e turva e onde se observou apenas algumas microalgas, mas sem crescimento de biomassa significativa, ou desenvolvimento de contaminantes microbiológicos.

### 4.2.3 Ensaio 3

Na Figura 14 apresentam-se as curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs *dias de cultivo* do terceiro ensaio. O crescimento foi realizado em regime mixotrófico com meio de cultura Zarrouk modificado, com diferentes concentrações de sal e adição de 1,0 g/l de glicose.



**Figura 14** - Curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs *tempo*, no terceiro ensaio

Tal como referido anteriormente houve um erro no início da cultura de concentração 35 g<sub>NaCl</sub>/l, o que inviabilizou o crescimento da microalga (Figura 15) e por este motivo esta cultura não se encontra representada na Figura 14.

Conclui-se, a partir da análise da Figura 14, que as 3 culturas tiveram um desenvolvimento similar. O que era de esperar, uma vez que mesmo na cultura com concentração de sal mais elevada apenas se aumentou a concentração de sal em 2 vezes relativamente à concentração de sal do inóculo, permitindo a rápida adaptação das microalgas às novas concentrações do terceiro ensaio. Mais uma vez o período de adaptação foi de 4 dias, após o qual se verificou uma boa produtividade de biomassa.

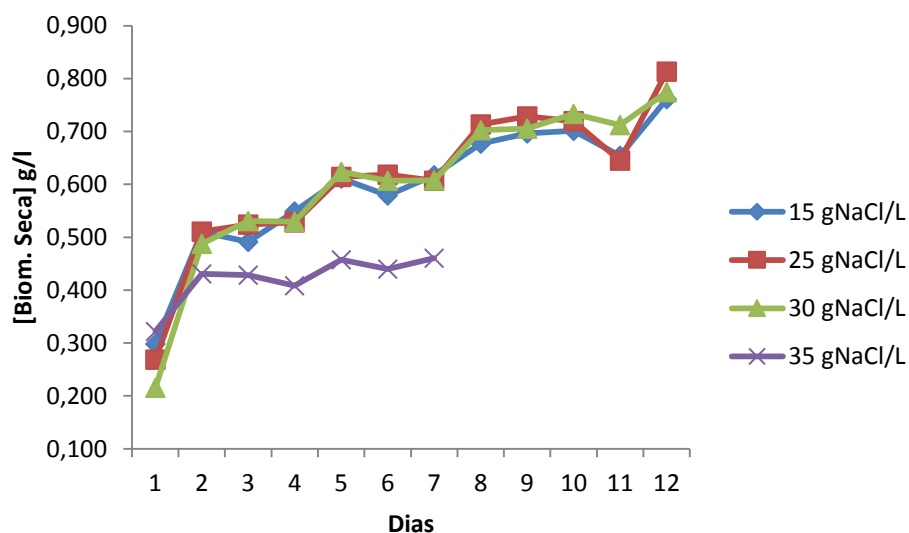




**Figura 15** - Culturas de *Arthrospira platensis* em regime mixotrófico com 1,0 g/l de glicose, no terceiro ensaio e no primeiro dia de cultivo

#### 4.2.4 Ensaio 4

Na Figura 16 apresentam-se as curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs *dias de cultivo* do quarto ensaio em conjunto com as curvas do terceiro ensaio. O crescimento foi realizado em regime mixotrófico com meio de cultura Zarrouk modificado, com diferentes concentrações de sal e adição de 1,0 g/l de glicose.



**Figura 16** - Curvas de crescimento [*Biomassa seca*] (g/l) vs *Dias*, no terceiro e quarto ensaio

O quarto ensaio apenas tem a duração de 7 dias, pois ainda se encontra a decorrer como referido anteriormente.

A partir dos dados disponíveis é possível concluir que o período de adaptação da cultura de 35

$\text{g}_{\text{NaCl}}/\text{l}$  foi de 4 dias, após os quais se iniciou o crescimento de biomassa. No entanto, a produtividade desta cultura não foi tão elevada como era esperado, pois apenas houve um incremento de 2,3 (3) vezes na concentração salina relativamente à concentração do inóculo e o seu desenvolvimento é equivalente ao das culturas de 10 e 15  $\text{g}_{\text{NaCl}}/\text{l}$  do primeiro ensaio, onde o incremento da concentração de sal é 10 e 15 vezes, respectivamente. Este poderá ser o valor limite suportado pela microalga em regime mixotrófico, sendo necessário aprofundar este estudo, ou poderá haver um outro motivo para o desenvolvimento desta cultura ser tão lento, como por exemplo, pressão osmótica demasiado elevada.

Conclui-se que a microalga *Arthrospira platensis* se adaptou bem ao crescimento nos meios salgados testados, visto não ter ocorrido a morte de nenhuma cultura nem o desenvolvimento de odor a matéria orgânica putrefacta.

### 4.3 Quantificação de óleos por gravimetria

Após a extracção de óleo, este foi quantificado gravimetricamente de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Os resultados obtidos são os apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Teor de lípidos totais na *Arthrospira platensis* resultante do ensaio 1

Ensaio	% lípidos final	% lípidos media final
P1 Bmeio 1	7,3 %	8,8 %
P1 Bmeio 2	10,3 %	
P1 Bmeio 3	x	
P1 1 1	4,5 %	4,8 %
P1 1 2	7,1 %	
P1 1 3	2,9 %	
P1 5 1	9,9 %	10,1 %
P1 5 2	6,4 %	
P1 5 3	14,1 %	
P1 10 1	3519,0 % *	1,0 %
P1 10 2	1,0 %	
P1 10 3	x	
P1 15 1	4,2 %	4,7 %
P1 15 2	5,1 %	
P1 15 3	94,0 % *	

\*Resultado rejeitado, possivelmente com erro experimental devido a evaporação incompleta do solvente

Os resultados desta tabela permitem concluir que houve alguma dificuldade na separação das fases, eliminação do metanol e da biomassa residual e na recuperação total dos lípidos nas amostras de menor dimensão. Concluiu-se ainda que, apesar de se encontrar em meio com uma concentração de sal considerável, a *Arthrospira platensis* não ultrapassou os 10 % de lípidos totais.

Será necessário obter os resultados dos lípidos totais dos restantes ensaios para que seja possível tirar outras conclusões.

#### 4.4 Determinação do Teor de Azoto Kjeldahl

Concluída a digestão das amostras, estas foram destiladas e tituladas de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Os resultados obtidos são os apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Resultados da determinação do teor de Azoto na *Arthrospira platensis* do ensaio 1

Ensaio	m Amostra (g)	V HCl (ml)	V amostra (ml)	Teor de Azoto
B1	0	1,002	167,3	0,00
B2	0			
P111	0,054	0,822	188,7	-1,34E-03
P112	0,066	0,270	189,1	2,00E-03
P1101	0,055	0,622	177,7	-1,58E-03
P1102	0,092	0,000	0,0	0,00E+00

Observando a tabela é possível perceber que houve problemas na aplicação deste método e que estes resultados não permitem retirar uma conclusão relativamente ao valor do teor azoto presente na biomassa da *Arthrospira platensis* das culturas do ensaio 1.

A primeira dificuldade na realização deste trabalho foi a escassa quantidade de biomassa, não houve biomassa da cultura de 5 g<sub>NaCl</sub>/l para realizar este ensaio e mesmo das culturas obtidas com as outras concentrações não houve o suficiente para realizar os ensaios em triplicado e para ser possível realizar os duplicados foi necessário reduzir na quantidade de amostra usada. Outras possíveis dificuldades prendem-se com a possibilidade do teor de azoto ser



muito baixo nas amostras, a concentração do titulante demasiado elevada e digestão deficiente ou em excesso na primeira etapa deste trabalho.

O factor de azoto-para-proteína em microalgas e cianobactérias é 5,95 <sup>[14]</sup>. Este valor seria usado para converter o teor de azoto em percentagem de proteína na biomassa microalgal. Na Tabela 5 encontram-se os valores esperados para a massa das amostras usadas neste trabalho.

**Tabela 5** - Valores esperados do teor de azoto e da percentagem de proteína na *Arthrospira platensis*

Ensaio	m Amostra (g)	N esperado (g)	% azoto esperado	% proteína esperada
B1	0	0,00	0	0,00
B2	0			
P111	0,054	4,05E-03	8 %	45 %
P112	0,066	4,95E-03	8 %	45 %
P1101	0,055	4,13E-03	8 %	45 %
P1102	0,092	6,90E-03	8 %	45 %

## 5. Conclusões e Trabalho Futuro

### 5.1 Conclusões

Os resultados mostram que a *Arthrospira platensis* consegue tolerar as condições de salinidade, mas verificou-se um período de adaptação durante o qual se observou um alongamento das células, em vez da sua forma tradicional espiral. Além disso, as condições mixotróficas favoreceram o crescimento e a produtividade de biomassa em comparação com as condições autotróficas.

Foi também possível concluir que esta microalga tem uma boa produtividade de biomassa mesmo em meios salinos e tem a capacidade de se adaptar rapidamente às novas condições do meio.

### 5.2 Objectivos Realizados

O objectivo desta dissertação visa a optimização das condições de cultivo, em meio salino, e adaptação ambiental em Portugal, de uma variedade do género *Arthrospira*. Este objectivo primário foi atingido com sucesso na medida em que a *Arthrospira platensis*, microalga seleccionada, teve um bom desenvolvimento num meio com aproximadamente a mesma concentração de sal do mar, nas condições atmosféricas e ambientais de Portugal e em regime mixotrófico com 1 g/l de glicose como fonte de carbono.

O objectivo de quantificar os lípidos e as proteínas existentes na biomassa resultante do crescimento em meio salino apenas foi alcançado para o primeiro ensaio, tendo ficado a faltar fazer este estudo para mais dois ensaios.

A análise quantitativa e qualitativa da composição da biomassa da microalga, com a finalidade de avaliar a sua aplicabilidade após o fraccionamento para utilização em biorrefinaria, não foi possível realizar, devido à falta de tempo. Assim como também não foi possível estudar as técnicas de fraccionamento que melhor se enquadrassem nos resultados da análise da composição da biomassa.

### 5.3 Outros Trabalhos Realizados

Para além do exposto, foi feita a manutenção e repicagem de culturas. Assim:

- Manteve-se a cultura, em matraz de 5 l, de *Arthrospira maxima* (adição de meio fresco);
- Manteve-se a cultura, em matraz de 5 l, de *Arthrospira platensis* (adição de meio fresco);
- Inoculou-se um matraz de 1 l com uma segunda amostra enviada pela empresa A4F. Quando esta cultura se tornou densa (ou seja, alcançou o estado estacionário), foi acrescentado 2 g/l de NaCl ao meio de cultura. Duas semanas mais tarde, voltou-se a acrescentar mais 2 g/l de NaCl. No final de um terceiro intervalo de 2 semanas, voltou-se a acrescentar 1 g/l de NaCl ao meio de cultura. Decorridas duas semanas, esta cultura foi separada do meio e a biomassa resultante foi dividida em duas. Uma parte serviu de inóculo num novo matraz de 1 l com meio Zarrouk e foi-lhe adicionado apenas 2,5 g/l (correspondente a metade da concentração de sal a que esta cultura estava habituada) para observar a sua reacção. Verificou-se que forma novamente aglomerados de biomassa e deposita no fundo, diminuindo a densidade da cultura, como se tivesse sido exposta a uma elevada concentração de sal. Começando a modificar este comportamento ao fim de uma semana. A segunda parte da biomassa foi mantida num matraz, com pouco meio, no frigorífico.
- Inoculou-se um matraz de 1 l com uma terceira amostra enviada pela empresa A4F, com um meio também disponibilizado pela empresa. Quando esta cultura demonstrou sinais de pH demasiado elevado, foi separada desse meio e transferida para outro matraz com meio Zarrouk modificado, servindo como inóculo. Desde então, esta cultura foi apenas mantida com adições de meio Zarrouk fresco.

### 5.4 Limitações e Trabalho Futuro

Não foi possível realizar a quantificação de hidratos de carbono em todos os ensaios, nem foi possível realizar a quantificação de proteínas e de lípidos nos dois últimos ensaios. Consequentemente não foi possível realizar uma análise quantitativa e qualitativa da composição da biomassa da microalga, com a finalidade de avaliar a sua aplicabilidade após o fraccionamento para utilização em biorrefinaria. Estes e outros trabalhos não foram realizados

por questões relacionadas com a falta de tempo, disponibilidade de alguns equipamentos e materiais, horário de funcionamento do laboratório onde se realizou o ensaio e devido a interrupções festivas.

Seria interessante, no futuro, realizar ensaios com meio industrial salino, outros ensaios com uma mistura em diferentes proporções de meio de cultura Zarrouk e água do mar e posteriormente directamente em água do mar (após um estudo da sua composição para que fosse possível acrescentar alguns nutrientes essenciais que pudessem estar em falta). Os nutrientes em falta na água do mar poderiam, por exemplo, ser obtidos a partir de efluentes industriais alimentares, como o efluente cervejeiro, ou subprodutos da transformação da cana-de-açúcar (retirados antes de se misturarem com outros efluentes).

Seria interessante estudar um suplemento para o meio de cultura, para que houvesse maior produção de proteína pelas microalgas. Melhorar, ou mesmo substituir, o tampão do meio de cultura para que o pH da cultura não subisse em tão pouco tempo, permitindo cultivos por períodos mais longos sem ser necessário renovar o meio. Fazer o cultivo ao ar livre, dependente das condições atmosféricas e tendo como fonte luminosa apenas o sol, em meio salino. Estudar os efeitos da secagem ao sol ao nível do odor, paladar, aspecto e composição da biomassa oriunda de um meio salino, como o mar, com suplementos provenientes de efluentes industriais. Modificar o método de separação das microalgas do meio, substituindo o hidróxido de sódio a 40 % por outro método com efeitos equivalentes, ou acrescentar um passo de lavagem com água para que a biomassa pudesse ser aplicada na indústria alimentar.

## 5.5 Apreciação final

O período destinado à realização desta dissertação foi muito curto (cerca de 4 meses, interrompidos pelas férias de Natal. O trabalho com microorganismos depende dos mesmos e nem sempre se desenvolve ao ritmo pretendido. Uma cultura em condições menos adequadas pode levar a atrasos substanciais na realização dos trabalhos.

Atendendo às condições possíveis de desenvolvimento deste estudo, foi feito um bom trabalho no cultivo desta microalga em meio salino e adaptação ao ambiente em Portugal. Foi atingido o objectivo de adaptar a *Arthrospira platensis* a uma concentração salina próxima da água do mar, com um bom desenvolvimento da mesma.

Gostaria que tivesse sido possível iniciar os ensaios mais cedo (começaram apenas em Dezembro, quando finalmente tinha sido produzida uma cultura-mãe suficientemente densa). Dessa forma, teria sido possível aguardar que as culturas atingissem o estado estacionário, resultando numa maior quantidade de biomassa no final de cada ensaio, o que permitiria fazer mais testes e com melhores resultados. Assim, talvez tivesse sido possível realizar ensaios em meio salino industrial ou estudar outros parâmetros de cultivo importantes.

## Referências

- [1] Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232.
- [2] Richmond, A., 2004, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd.
- [3] Barrow, C., Shahidi, F. *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008.
- [4] Kamm, B., Gruber, P. R., Kamm, M., 2006, *Biorefineries – Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Directions. Vol. 1*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [5] Cherubini, F., 2010, The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51 (7), 1412-1421.
- [6] Pandey, A., Hofer, R., Larroche, C., Taherzadeh, M., Nampoothiri, M., 2015, *Industrial - Biorefineries & White Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam.
- [7] Vonshak, A., 2002, *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*, Taylor & Francis e-Library.
- [8] Kamm, B., Kamm, 2004, M. *Principles of Biorefineries, Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), 137-145.
- [9] UTEX, 2015, *The culture collection of algae of the University of Texas at Austin, USA*. URL: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/bulkcultures.aspx>, visualizado em 28.09.2015.
- [10] Arthrospira – Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Arthrospira>, acedido em 8/10/2015.
- [11] Salinity – Wikipedia, <https://en.wikipedia.org/wiki/Salinity>, acedido em 8/10/2015.
- [12] Zarrouk, C., 1966, *Contribution a l'étude d'une cyanobactérie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setchell et Gardner) Geitler*. PhD thesis, University of Paris, France.
- [13] A guide to Kjeldhal nitrogen determination methods and apparatus, LABCONCO – ExpotechUSA, <http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>, acedido em 5/01 /2015.
- [14] López, C., García, M., Fernández, F., Bustos, C., Chisti, Y., Sevilla, J., 2010, Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Bioresour Technol.* 101(19), 7587-91.
- [15] Bligh, E, Dyer, W., 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 37, 911-917.



## Anexo 1. Curva de Calibração para a *Arthrospira platensis*

A curva de calibração foi traçada a partir da leitura da absorvância de 12 soluções padrão de concentração conhecida, em espectrofotómetro UV-Vis a 682 nm, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

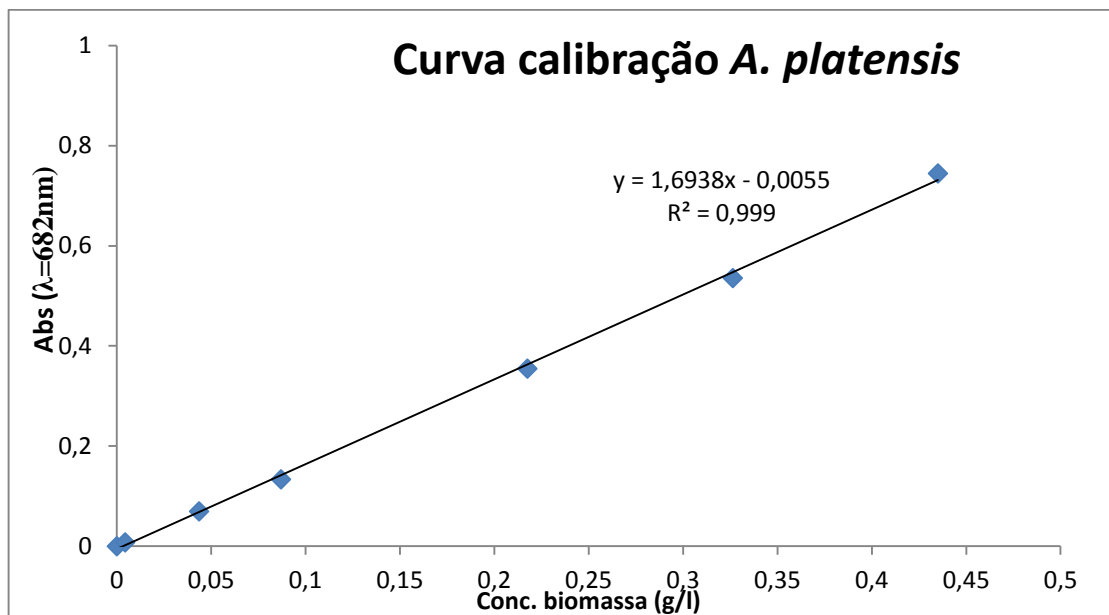
Os resultados obtidos encontram-se na **Error! Reference source not found.**:

**Tabela 6** - Valores de absorvância determinados para as 12 soluções padrão.

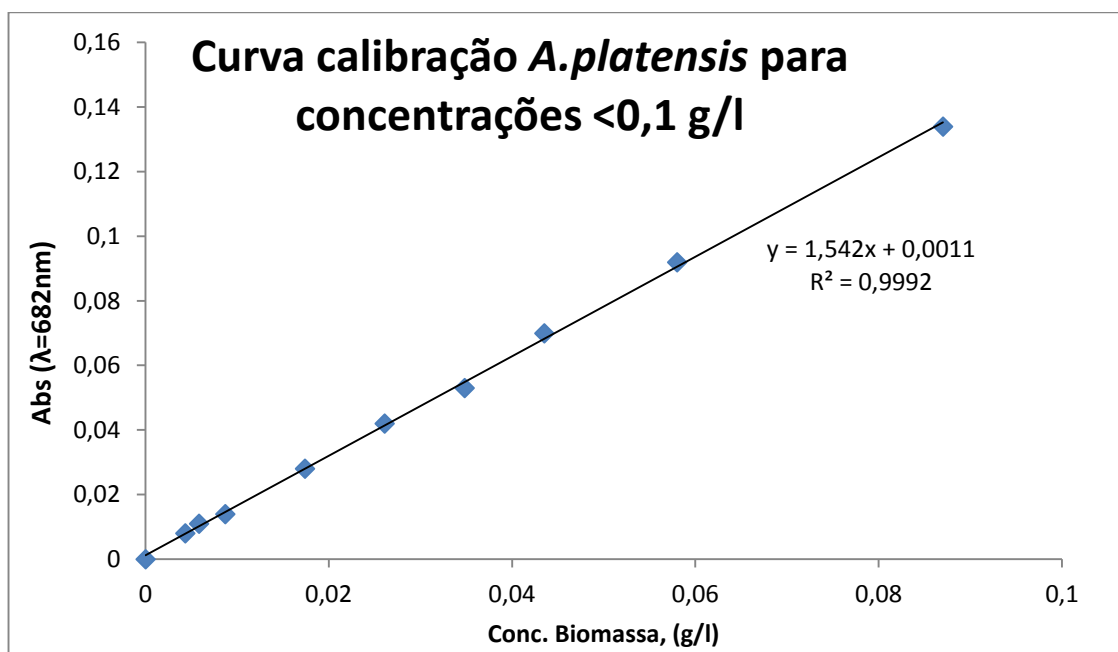
Solução padrão número	[Biomassa seca] g/l	Abs (682 nm)
1	0,435	0,745
2	0,326	0,536
3	0,218	0,355
4	0,087	0,134
5	0,058	0,092
6	0,044	0,070
7	0,035	0,053
8	0,026	0,042
9	0,017	0,028
10	0,009	0,014
11	0,006	0,011
12	0,004	0,008

Com os valores apresentados na **Error! Reference source not found.** traçaram-se duas curvas de calibração. A primeira para valores de concentrações de biomassa superiores a 0,1 g/l (**Error! Reference source not found.**), com um valor de coeficiente de correlação  $R^2 = 0,999$ , isto é,  $R = 0,9995$ . A segunda curva foi obtida para valores de concentração inferiores a 0,1 g/l (**Error! Reference source not found.**), com um valor de coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9992$ , isto é,  $R = 0,9996$ .





**Figura 17** - Curva de calibração da absorvância da *Arthrospira platensis*, para concentrações superiores a 0,1 g/l, a 682 nm.



**Figura 18** - Curva de calibração da absorvância da *Arthrospira platensis*, para concentrações inferiores a 0,1 g/l, a 682 nm.

## Anexo 2. Avaliação do crescimento microalgal

A designação dada a cada matraz segue o esquema  $P\ n_1^0n_2^0n_3^0$ , cuja legenda se apresenta em seguida:

P – Ensaio com *Arthrospira platensis*

$n_1^0$  - Número do ensaio (1 dígito);

$n_2^0$  - Valor referente à concentração em g/l (1, 5, 10, 15, 25, 30 e 35) de sal nesse matraz (1 ou 2 dígitos);

$n_3^0$  - Valor referente ao número do triplicado a que esse matraz corresponde número 1, 2 ou 3 (1 dígito);

Nos 3 ensaios, em matrizes de 500 ml, fez-se variar as concentrações de sal (NaCl) e avaliou-se o crescimento das culturas de acordo com o referido anteriormente no ponto 2.3.

### Anexo 2.1. Primeiro ensaio ( $n_1^0=1$ ) em regime mixotrófico de quatro concentrações diferentes de sal no meio de cultura, com adição de carbono orgânico (glicose)

O primeiro ensaio teve a duração de 13 dias, no entanto aos Domingos não foi possível fazer as leituras das absorvâncias e por este motivo na Tabela 7 apenas se faz referência a 11 dias.

**Tabela 7** - Avaliação do crescimento no primeiro ensaio

Dia	Cultura	Absorvância média (682 nm)	Conc. média final (g/l)
1	P111	0,704	0,419
	P151	0,500	0,298
	P1101	0,662	0,394
	P1151	0,597	0,356
2	P112	0,701	0,417
	P152	0,672	0,400
	P1102	0,692	0,412
	P1152	0,656	0,391

Dia	Cultura	Absorvância	Conc.
3	P113	0,727	0,432
	P153	0,640	0,381
	P1103	0,698	0,415
	P1153	0,601	0,358
4	P111	0,715	0,425
	P151	0,648	0,386
	P1101	0,690	0,411
	P1151	0,596	0,355
5	P112	0,806	0,479
	P152	0,764	0,454
	P1102	0,838	0,498
	P1152	0,706	0,420
6	P113	0,862	0,512
	P153	0,745	0,443
	P1103	0,832	0,494
	P1153	0,706	0,420
7	P111	0,872	0,518
	P151	0,777	0,462
	P1101	0,841	0,500
	P1151	0,708	0,421
8	P112	0,895	0,532
	P152	0,885	0,526
	P1102	0,968	0,575
	P1152	0,809	0,481
9	P113	1,003	0,595
	P153	0,874	0,519
	P1103	0,968	0,575
	P1153	0,809	0,481
10	P111	0,999	0,593
	P151	0,909	0,540
	P1101	0,976	0,579
	P1151	0,830	0,493
11	P112	1,122	0,666
	P152	1,036	0,615
	P1102	1,167	0,692
	P1152	0,952	0,565

### Anexo 2.2. Primeiro ensaio ( $n_1^0=2$ ) em regime mixotrófico de quatro concentrações diferentes de sal no meio de cultura (5, 10, 15 e 25 g/l), com adição de carbono orgânico (glicose)

O segundo ensaio teve a duração de 21 dias, no entanto aos Domingos e nos dias 24 e 25 de Dezembro e 1 de Janeiro não foi possível fazer as leituras das absorvâncias e por este motivo na Tabela 8 apenas se faz referência a 15 dias.

A cultura P2 30 3 ao fim do segundo dia apresentava uma coloração amarelada e estava turva, não se verificando o crescimento de uma quantidade significativa de microalgas.

**Tabela 8** - Avaliação do crescimento no terceiro ensaio

Dia	Cultura	Absorvância média (682 nm)	Conc. média final (g/l)
1	P251	0,749	0,445
	P2150	0,775	0,461
	P2251	0,825	0,490
	P2301	0,764	0,454
2	P252	0,705	0,419
	P2152	0,678	0,404
	P2252	0,710	0,422
	P2302	0,718	0,427
3	P253	0,695	0,414
	P2153	0,674	0,401
	P2253	0,698	0,415
	P2303	0,986	0,585
4	P251	0,748	0,445
	P2150	0,736	0,438
	P2251	0,713	0,424
	P2301	0,683	0,406
5	P252	0,817	0,486
	P2152	0,753	0,448
	P2252	0,643	0,383
	P2302	0,643	0,383
6	P253	0,884	0,525
	P2153	0,752	0,447
	P2253	0,631	0,376
	P2303	0,919	0,546

Dia	Cultura	Absorvância média (682 nm)	Conc. média final (g/l)
7	P251	0,908	0,539
	P2150	0,904	0,537
	P2251	0,732	0,435
	P2301	0,794	0,472
8	P252	1,028	0,610
	P2152	0,920	0,546
	P2252	0,663	0,395
	P2302	0,688	0,409
9	P253	1,178	0,699
	P2153	0,954	0,566
	P2253	0,716	0,426
	P2303	0,863	0,513
10	P251	1,167	0,692
	P2150	1,122	0,666
	P2251	0,866	0,515
	P2301	0,910	0,541
11	P252	1,250	0,741
	P2152	1,090	0,647
	P2252	0,768	0,457
	P2302	0,836	0,497
12	P253	1,326	0,786
	P2153	1,101	0,653
	P2253	0,860	0,511
	P2303	0,874	0,519
13	P251	1,411	0,836
	P2150	1,356	0,804
	P2251	1,105	0,656
	P2301	1,136	0,674
14	P252	1,577	0,934
	P2152	1,309	0,824
	P2252	1,041	0,618
	P2302	1,021	0,606
15	P253	1,406	1,023
	P2153	0,833	0,833
	P2253	1,028	0,610
	P2303	0,885	0,526

### Anexo 2.3. Primeiro ensaio ( $n_1^0=3$ ) em regime mixotrófico de quatro concentrações diferentes de sal no meio de cultura (15, 25, 30 e 35 g/l), com adição de carbono orgânico (glicose)

O terceiro ensaio teve a duração de 14 dias, no entanto aos Domingos não foi possível fazer as leituras das absorvâncias e por este motivo na Tabela 6 apenas se faz referência a 12 dias. Houve um erro na cultura de 35 g/l e por isso não foi verificado crescimento nas culturas desta concentração de sal, estavam amareladas e turvas. Assim, foi necessário fazer um quarto ensaio para repetir a concentração de 35 g/l nas mesmas condições do ensaio número 3.

**Tabela 9 - Avaliação do crescimento no terceiro ensaio**

Dia	Cultura	Absorvância média (682 nm)	Conc. média final (g/l)
1	P3151	0,500	0,298
	P3251	0,450	0,269
	P1301	0,359	0,215
	P1351	0,097	0,061
2	P3152	0,859	0,510
	P3252	0,860	0,511
	P3302	0,821	0,488
	P3352	0,152	0,093
3	P3153	0,827	0,491
	P3253	0,882	0,524
	P3303	0,893	0,530
	P3353	0,879	0,522
4	P3151	0,924	0,549
	P3251	0,889	0,528
	P1301	0,891	0,529
	P1351	0,815	0,484
5	P3152	1,030	0,611
	P3252	1,035	0,614
	P3302	1,051	0,624
	P3352	0,747	0,444
6	P3153	0,975	0,579
	P3253	1,042	0,618
	P3303	1,023	0,607
	P3353	0,840	0,499

Dia	Cultura	Absorvância	Conc. média
7	P3151	1,040	0,617
	P3251	1,023	0,607
	P1301	1,024	0,608
	P1351	0,787	0,468
8	P3152	1,141	0,677
	P3252	1,203	0,713
	P3302	1,185	0,703
	P3352	0,710	0,422
9	P3153	1,174	0,696
	P3253	1,229	0,729
	P3303	1,190	0,706
	P3353	0,828	0,492
10	P3151	1,182	0,701
	P3251	1,213	0,719
	P1301	1,237	0,734
	P1351	0,779	0,463
11	P3152	1,102	0,654
	P3252	1,087	0,645
	P3302	1,201	0,712
	P3352	0,763	0,454
12	P3153	1,284	0,761
	P3253	1,372	0,813
	P3303	1,306	0,774
	P3353	0,814	0,484

**Anexo 2.4. Primeiro ensaio ( $n_1^0=4$ ) em regime mixotrófico de quatro concentrações diferentes de sal no meio de cultura (35 g/l), com adição de carbono orgânico (glicose)**

O quarto ensaio teve a duração de 9 dias (incluindo o dia 31/01/2016, pois o ensaio ainda se encontra a decorrer), no entanto aos Domingos não foi possível fazer as leituras das absorvâncias e por este motivo na Tabela 7 apenas se faz referência a 7 dias.

**Tabela 10** - Avaliação do crescimento da *Arthrospira platensis* no quarto ensaio

Dia	Cultura	Absorvância média (682 nm)	Conc. média final (g/l)
1	P4351	0,540	0,322
2	P4352	0,724	0,431
3	P4353	0,720	0,428
4	P4351	0,686	0,408
5	P4352	0,769	0,457
6	P4353	0,740	0,440
7	P4351	0,774	0,460





## Anexo 3. Extracção de óleo por solventes e quantificação por gravimetria

Procedimento adaptado do método de Bligh e Dyer [15]:

- a) Na balança digital de precisão  $\pm 5 \times 10$  g, tarar tubos de CQO;
- b) Nos tubos de CQO tarados pesar as biomassas algais húmidas (no máximo 180 mg);
- c) Sabendo-se que cerca de 90 % da biomassa algal húmida é constituída por água (ver Anexo 6), determina-se a massa de água como  $m_{\text{água}} = 0,90 \times m_{\text{biomassa húmida}}$  (g);  
água biomassa húmida
- d) Como 90% da biomassa algal é água e sendo  $\rho_{\text{água}} = 1$  g/ml, pode-se considerar que  $\rho_{\text{biomassa húmida}} \cong 1$  g/ml, o que permite obter a aproximação:  $m_{\text{biomassa húmida}} (g) \cong V_{\text{biomassa húmida}} (ml)$ ;
- e) A 1ª extracção é feita com (1:2:0,8) clorofórmio:metanol:água. Como a fracção de água na  $m_{\text{biomassa húmida}}$  é de 0,90 a proporção de solventes deverá ser corrigida para biomassa húmida (1,125; 2,25; 0,9) clorofórmio:metanol:água:
  1. Na hotte, com a extracção de ar ligada, adicionar no tubo de ensaio tarado com a biomassa algal húmida  $V_{\text{clorofórmio}} = 1,125 * V_{\text{biomassa húmida}} (ml)$ ;
  2. Em seguida adicionar  $V_{\text{metanol}} = 2,225 * V_{\text{biomassa húmida}} (ml)$ ;
  3. Agitação da mistura em tubos fechados com tampa, em vortex (Snijders 34524), a velocidade moderada, durante cerca de cinco minutos;
- f) Colocar os tubos de ensaio num banho de ultra-sons (Crest), de modo a que os tubos fiquem imersos na água até à altura do seu conteúdo. O procedimento deverá ser executado a 25 °C durante 20 minutos;
- g) A 2ª extracção é feita com base na relação (2:2:1,8) clorofórmio:metanol:água, ou seja, o volume dos solventes na nova adição será ( $x_1 : 0 : x_2$ ):

1.  $x_1(\text{clorofórmio}) = V_{\text{metanol}} - V_{\text{clorofórmio}}$  (volumes da alínea e) i.);

2.  $x_2(\text{água}) = \frac{(V_{\text{metanol}} * 1,8)}{2}$  (volume de metanol da alínea e) ii.);

3. Agitação em vortex a velocidade moderada, durante cerca de um minuto;
- h) Centrifugação (Centrifuga Orto Alresa, Digicen) a 4000 rpm durante 20 minutos;
- i) Após a centrifugação distinguem-se nitidamente três fases:
1. Superior (menos densa ou metanólica);
  2. Intermédia, constituída pela biomassa residual;
  3. Inferior (densa ou clorofórmica); os lípidos encontram-se dissolvidos nesta fase;
- j) Com uma pipeta de Pasteur pipetar e rejeitar a fase superior; furar a fase intermédia e recolher para um goblé previamente pesado a fase inferior;
- k) Deixar evaporar, na hotte, o clorofórmio presente na fase recolhida e pesar o conjunto “goblé + lípidos” até que não se verifiquem alterações de massa. Está assim encontrada a massa de lípidos para o ensaio em estudo;
- l) Determinar a percentagem de óleo presente na biomassa algal (considerando que 10 % dos lípidos totais ficam retidos na biomassa residual).

Determinação da produtividade máxima lipídica e resultados obtidos com este método:

	P amostra (g)	V(H <sub>2</sub> O) <sub>1</sub>	V(Cl <sub>2</sub> o <sub>2</sub> ) <sub>1</sub>	V(Metanol) <sub>1</sub>	V(Cl <sub>2</sub> o <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	V(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	P(gobele) g	P(gobele+amostra) g	P lípidos (g)	%lípidos	%lípidos final	%lípidos media final
<b>P1 Bmeio 1</b>	0,09	0,81	1,01	2,03	1,01	1,01	15,885	15,891	0,006	6,7%	7,3%	8,8%
<b>P1 Bmeio 2</b>	0,096	0,86	1,08	2,16	1,08	1,08	15,272	15,281	0,009	9,4%	10,3%	
<b>P1 Bmeio 3</b>	x	0,30	0,37	0,74	0,37	0,37	15,371	x	x	x	x	
<b>P1 1 1</b>	0,122	1,10	1,37	2,74	1,37	1,37	15,416	15,421	0,005	4,1%	4,5%	
<b>P1 1 2</b>	0,108	0,97	1,22	2,44	1,22	1,22	15,293	15,300	0,007	6,5%	7,1%	4,8%
<b>P1 1 3</b>	0,114	1,03	1,28	2,56	1,28	1,28	15,255	15,258	0,003	2,6%	2,9%	
<b>P1 5 1</b>	0,1	0,90	1,13	2,26	1,13	1,13	14,998	15,007	0,009	9,0%	9,9%	10,1%
<b>P1 5 2</b>	0,103	0,93	1,16	2,32	1,16	1,16	15,424	15,43	0,006	5,8%	6,4%	
<b>P1 5 3</b>	0,109	0,98	1,23	2,46	1,23	1,23	15,434	15,448	0,014	12,8%	14,1%	
<b>P1 10 1</b>	0,11	0,99	1,24	2,48	1,24	1,24	14,729	18,248	3,519	3199,1%	3519,0%	
<b>P1 10 2</b>	0,106	0,95	1,19	2,38	1,19	1,19	13,415	13,416	0,001	0,9%	1,0%	1,0%
<b>P1 10 3</b>	x	0,76	0,95	1,09	0,95	0,95	13,484	x	x	x	x	
<b>P1 15 1</b>	0,104	0,94	1,17	2,34	1,17	1,17	15,284	15,288	0,004	3,8%	4,2%	
<b>P1 15 2</b>	0,108	0,97	1,22	2,44	1,22	1,22	15,277	15,282	0,005	4,6%	5,1%	4,7%
<b>P1 15 3</b>	0,117	1,05	1,32	2,64	1,32	1,32	15,106	15,206	0,1	85,5%	94,0%	



## Anexo 4. Determinação do teor de Azoto Kjeldhal

Procedimento disponibilizado pelo Laboratório de Tecnologia Química do ISEP para a etapa de digestão:

Equipamento	Marca
DIGESTOR DE AMOSTRAS (6 postos)	RAYPA
	Código DIGAKJ/01

**1. Operação**

- Preparar previamente as amostras de acordo com os procedimentos que se encontram em anexo.  
**ATENÇÃO!** Se houver algum posto sem tubo, colocar um tubo com igual volume de reagente, para não haver danos no digestor.
- Colocar os tubos no digestor, adaptando correctamente o sistema de sucção dos gases e abrir a torneira de água que se encontra adaptada ao equipamento, muito lentamente.
- Ligar o controlador (POWER) e efectuar a programação dos parâmetros necessários aquecimento, premindo uma das teclas  $\nabla$  ou  $\Delta$  durante alguns segundos até que o valor do *set-point* no monitor entre em modo de edição. De forma a assegurar que os parâmetros programados foram aceites, desligar e ligar novamente e verificar o *set-point*. Os patamares necessários e a temperatura final são dependentes do método.
- Após o término do ensaio – o besouro do controlador dispara – desligar o aparelho e esperar que as amostras arrefeçam mantendo a sucção dos gases a funcionar até que termine a sua produção contínua.

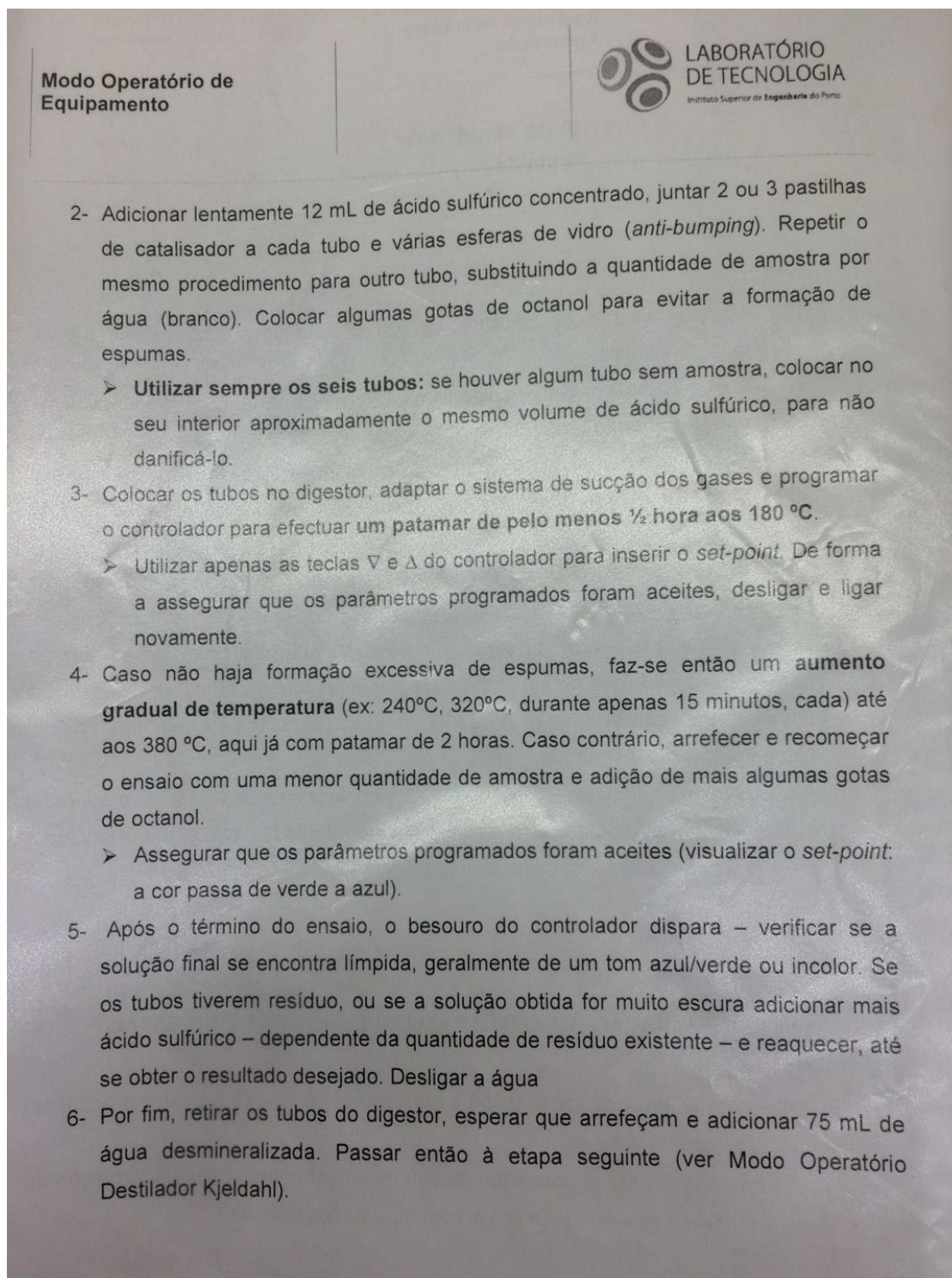
**ANEXOS**

**(A) DETERMINAÇÃO DO AZOTO KJELDAHL – ETAPA DE DIGESTÃO**

1- Pesar rigorosamente cerca de 0,250 g (amostra sólida) ou 25 mL (amostra líquida) para cada tubo de digestão.

**Nota:** A toma pode variar dependendo do tipo de amostra: por vezes há formação de gases que tornam a digestão impossível com os volumes indicados.

**Figura 19** - Procedimento para determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de digestão (1/2)



**Figura 20** - Procedimento para determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de digestão (2/2)



Procedimento disponibilizado pelo Laboratório de Tecnologia Química do ISEP para a etapa de destilação e titulação:

<p><b>Equipamento</b></p> <p style="text-align: center;"><b>DESTILADOR</b></p> <p style="text-align: center;"><b>DETERMINAÇÃO DE AZOTO KJELDAHL E AZOTO AMONIACAL</b></p> <p style="text-align: center;"><b>MOD. DNP 1500</b></p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Marca</b></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">RAYPA</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"><b>Código</b></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">DESTLT/01e 02</td> </tr> </table>	<b>Marca</b>	RAYPA	<b>Código</b>	DESTLT/01e 02
<b>Marca</b>					
RAYPA					
<b>Código</b>					
DESTLT/01e 02					

**1. INTRODUÇÃO**

A unidade de destilação é um instrumento usado para destilações rápidas e é aplicada na 2ª parte do método de determinação de azoto kjeldahl. Esta unidade faz automaticamente a diluição da amostra com água desmineralizada, alcaliniza-a com solução de NaOH a 40% (m/m) e procede à sua destilação, sendo o destilado recolhido num matraz para posterior titulação. Os reservatórios de água e de solução de alcalina fazem parte desta unidade.

**2. REAGENTES**

Solução aquosa de hidróxido de sódio a 40% (m/m)

Solução aquosa de ácido bórico a 2% (m/m)

Solução aquosa de sulfato de sódio a 0,7g/L

Solução padrão de ácido clorídrico 0,01N

Indicador misto (verde de bromocresol com vermelho de metilo)

Água desmineralizada

**3. OPERAÇÃO**

1. ABRIR A TORNEIRA DA BANCADA QUE ALIMENTA A ÁGUA AO CIRCUITO DE REFRIGERAÇÃO DO SISTEMA ( A ABERTURA FAZ-SE RODANDO NO SENTIDO DO OPERADOR! )
2. Verificar se as quantidades de água e NaOH existentes nos reservatórios são suficientes para realizar a destilação.
3. Verificar, antes e durante a utilização do destilador, se o nível de electrólito na câmara de geração de vapor está dentro dos limites (**GENERATOR, luz piloto MAX acesa**). Quando passar para **MIN (luz piloto amarela)**, **CUIDADO!** É necessário repor o electrólito urgentemente. Terminar a destilação de imediato e pedir auxílio ao Técnico de serviço para urgentemente **repor o electrólito (ver ponto 5.)**
4. Ligar o aparelho no comutador (1/0 POWER).

**Figura 21** - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (1/4)



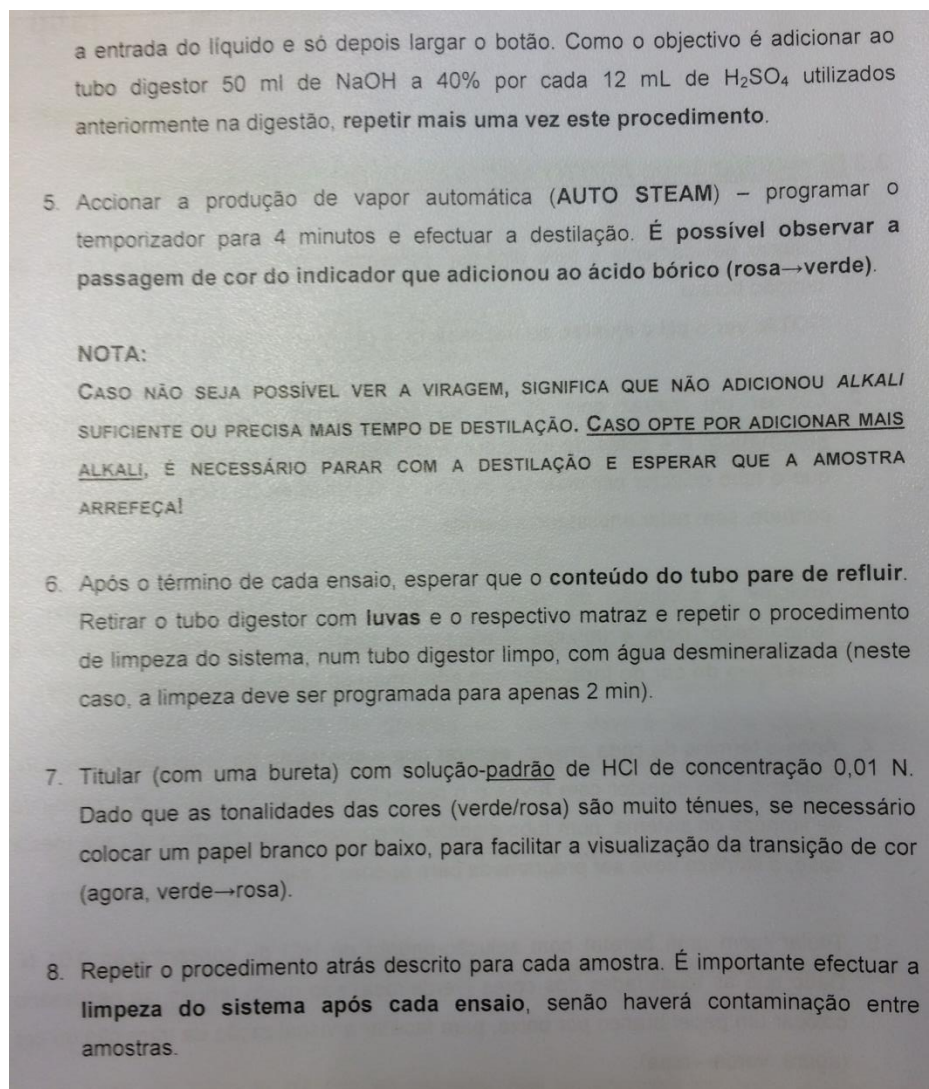
### 3.1 LIMPEZA INICIAL DO SISTEMA

1. Inserir um tubo digestor (ou tubo de ensaio) com cerca de 100 mL de água desmineralizada no local apropriado (suporte do tubo de ensaio) – ter o cuidado de ajustar o bocal com firmeza e suavidade.
2. Colocar um matraz, de colo largo, vazio como vaso de recolha.
3. Regular o temporizador para 4 minutos.
4. Premir o comutador de destilação (**AUTO STEAM**).
5. Esperar que se inicie a formação de vapor. Verificar se o vapor condensado surge límpido no matraz, caso contrário, deixar lavar mais alguns minutos, premindo novamente o comutador AUTO.
6. Após disparar o bico, esperar que o conteúdo do tubo pare de refluir e só então retirar o tubo com luvas – **cuidado está quente!**
7. Retirar o matraz de lavagem.

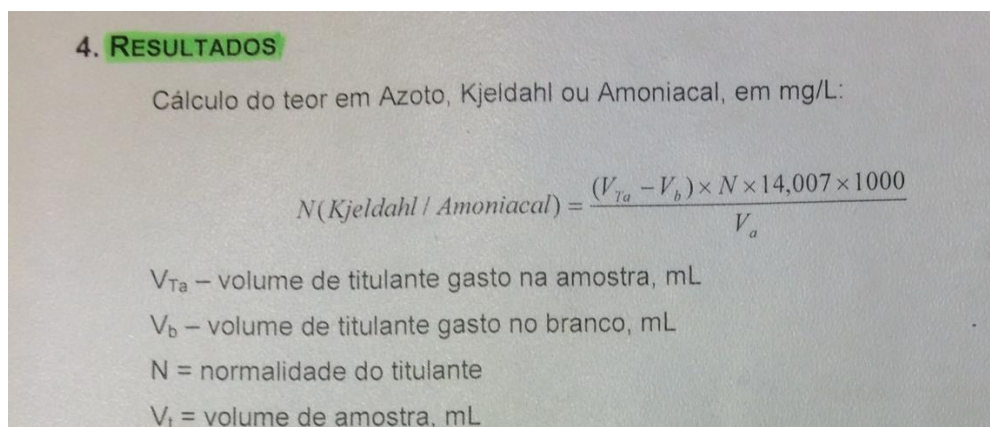
### 3.2 DETERMINAÇÃO DO AZOTO KJELDAHL NAS AMOSTRAS

1. Adicionar 75 mL de água desmineralizada a cada tubo que contém a amostra previamente digerida.
2. Colocar devidamente o tubo digestor que contém a amostra.
3. Colocar um matraz com 25 mL de ácido bórico a 2% (usar o doseador automático) e 4 gotas de indicador misto, colocando o matraz numa posição tal que o tubo colector por onde irá escorrer o destilado esteja totalmente submerso, contudo, sem estar encostado à parede.
4. Premir e manter durante alguns segundos o comando **ALKALI DOSING** – cada “bombada” representa um volume de 25 mL de solução de NaOH a 40%. Visualizar

**Figura 22** - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (2/4)



**Figura 23 - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (3/4)**



**Figura 24 - Determinação do teor de Azoto Kjeldhal, etapa de destilação (4/4)**



## Anexo 5. Determinação da massa de água contida na biomassa microalgal húmida

Para a determinação da massa de água contida na biomassa microalgal húmida procedeu-se à recolha de um determinado volume de cultura mãe de *Arthrospira platensis*. Prepararam-se e pesaram-se 3 placas de petri e 3 filtros. Realizou-se a filtração de 3 volumes de cultura mãe em vácuo. Pesou-se os filtros com as placas e a biomassa húmida. Colocou-se as 3 placas na estufa a 102 °C durante dois dias. Voltou-se a pesar no final do primeiro dia e no final do segundo, para verificar se a massa já tinha estabilizado. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

**Tabela 11** - Determinação do teor de biomassa seca

m Placa de Petri (g)	m Placa de Petri +Filtro (g)	m Placa+Filtro+Biomassa Húmida (g)	m Biomassa Húmida (g)	m Biomassa seca (g)	% Biomassa seca	% média Biomassa seca	% Água
41,498	41,594	41,905	0,311	0,025	8,04	6,10	93,9
40,668	40,767	41,901	1,134	0,019	1,68		
36,027	36,125	36,453	0,328	0,020	6,10		

Exemplo de cálculo:

Biomassa húmida e Biomassa seca:

$$m(\text{Biom húmida}) = m(\text{Epp.} + \text{Biom húmida}) - m(\text{Epp.}) \text{ (g)}$$

$$m(\text{Biom seca}) = m(\text{Epp.} + \text{Biom seca}) - m(\text{Epp.}) \text{ (g)}$$

$$\% \text{ Biomassa seca} = (0,025 \times 100) / 0,311 = 8,04 \%$$

Determinação do teor de Água (m/m) presente na biomassa húmida:

$$\% \text{ Biomassa seca} + \% \text{ Água} = 100 \%$$

$$\% \text{ Água} = 100 - 6,10 = 93,9 \%$$

O valor esperado de percentagem de água era de 90. Para facilitar os cálculos foi usado o valor de percentagem de água de 90 % no ponto 2.4.



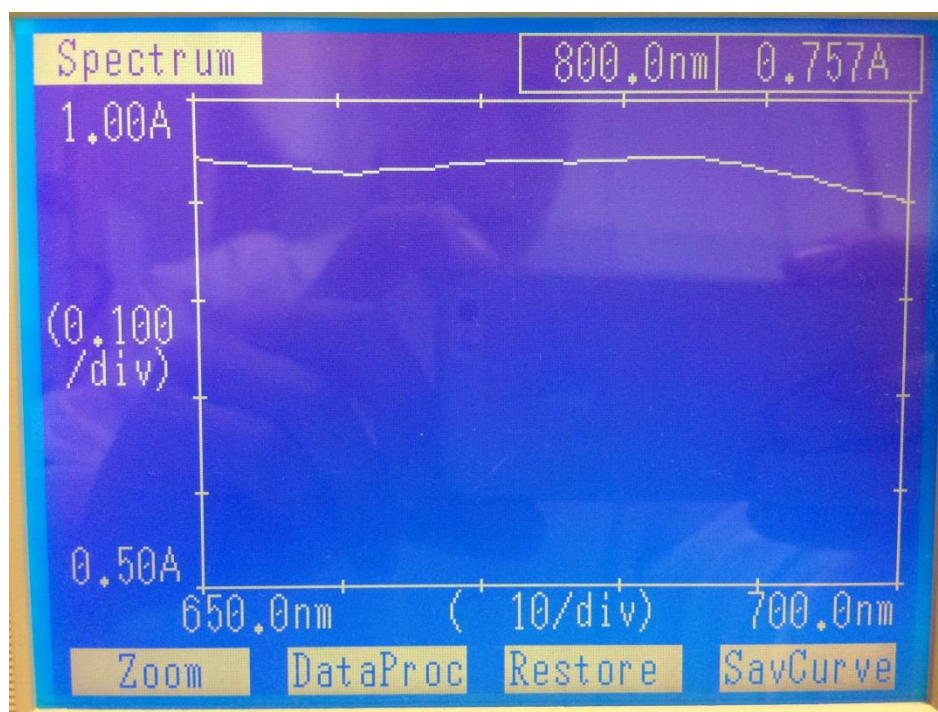


## Anexo 6. Gráficos *Absorvância vs Comprimento de onda* (nm), para determinação do pico de absorvância das microalgas (varrimento)

Realizou-se o varrimento de uma amostra de cada espécie de microalga com a finalidade de identificar o pico de absorvância máxima de cada uma. Esta determinação permitiu fazer as leituras de absorvância durante o crescimento das culturas dos ensaios a um comprimento de onda específico. A leitura a esse comprimento de onda corresponde a valores de absorvância o mais perto possível da absorvância real de cada amostra.

Verificou-se que o pico de absorvância máxima para *Arthrospira maxima* se localiza a 680 nm e o pico de absorvância máxima da *Arthrospira platensis* é maior a 682 nm.

### *Arthrospira maxima*



**Figura 25** - Varrimento para uma amostra de *Arthrospira maxima*

*Arthrospira platensis*



**Figura 26** - Varrimento para uma amostra de *Arthrospira platensis*